

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA FORMAÇÃO DE BIOMASSA, ASTAXANTINA E
PAREDE CELULAR DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA
LEVEDURA *Phaffia rhodozyma***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tania Maria Bordin
Bonfim

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Mara
Woranovicz Barreira

**CURITIBA
2008**

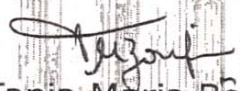


TERMO DE APROVAÇÃO

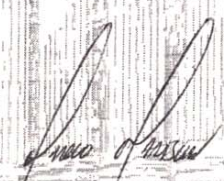
PRISCILA LAÍS LEITE SILVA

Título: "Avaliação comparativa da formação de biomassa, astaxantina e parede celular das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*".


Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim
Orientadora



Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 18 de setembro de 2008.

Aos meus pais, que abriram mão de tudo o que foi necessário pela nossa educação. Um pequeno retorno aos seus esforços, mostrando que aprendi que o conhecimento é uma das poucas coisas nunca se perde, e vale a pena buscá-lo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim, por ter feito tudo o que estava a seu alcance para que este trabalho tivesse sucesso, e pelo carinho e cuidado ao me ensinar o amor e a responsabilidade que a vida acadêmica exige de quem se dispõe a fazer parte dela. As palavras não são capazes de expressar meu agradecimento e amizade.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira, pelo otimismo, paciência e entusiasmo, mesmo com o pouco tempo do dia-a-dia.

À Professora Dra. Lucélia Donatti, do Laboratório de Biologia Celular, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela essencial colaboração na condução deste trabalho, viabilizando o emprego da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos Professores Dr. Aguinaldo José Nascimento e Dr. Cassyano Januário Correr pelo auxílio nas análises estatísticas e por estarem sempre dispostos a dividirem o tempo e os conhecimentos.

À Professora Dra. Débora Brand, pelo auxílio com a língua inglesa e à farmacêutica Graça, pelos ensaios em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

À Universidade Federal do Paraná, que, mais do que diplomas, me deu o orgulho de ser farmacêutica, além de verdadeiros amigos e momentos que nunca serão esquecidos.

À Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que existe pelo trabalho sério dos Professores e Técnicos Administrativos, e me proporcionou a oportunidade de crescer ainda mais como aluna desta Universidade.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Carolina, Thais, Gisele, Rodrigo, Fernanda, Flávia e Adélia e à técnica Ana Lucia, não só por terem ajudado em análises e pesquisas, mas principalmente pela companhia, o que tornou o trabalho muito mais simples.

Aos meus colegas de mestrado, por dividir os bons e maus momentos, desde a seleção até a conclusão dos trabalhos.

Ao meu Leandro, que nunca cobrou os longos domingos e feriados passados dentro do laboratório e, pelo contrário, sempre acompanhou e incentivou o meu trabalho, por compreender a importância dessa etapa da minha vida.

Aos meus pais Antonio Augusto e Sonia, e minhas irmãs Larissa e Fernanda, que não entendem absolutamente nada deste trabalho, mas entendem o mais

importante, o orgulho que tenho em cumprir mais esse desafio, e nunca me deixaram sequer questionar a minha capacidade em concluí-lo.

Aos colegas da Liga Paranaense de Combate ao Câncer, que facilitaram a conclusão desse trabalho por compreenderem todas as trocas de horário, cansaço e correria e me incentivarem sem restrições.

Aos amigos que sempre estiveram dispostos a se adaptarem aos meus horários, para, mais do que tudo, me darem a certeza de que se importavam com meu sucesso.

À Deus, que nos acompanha, faz fortes e nos anima todos os dias.

“Nada há de mais poderoso do que
a idéia que chegou no tempo certo”

Victor Hugo

RESUMO

A levedura *Phaffia rhodozyma* contém como principal pigmento carotenóide a astaxantina, o que lhe confere interesse comercial. A astaxantina é naturalmente encontrada no ambiente marinho e é responsável pela coloração de certos animais, incluindo salmão, lagostas, caranguejos e camarões. O órgão regulador Food and Drug Administration autorizou o uso da levedura *Phaffia rhodozyma* como aditivo na alimentação de peixes criados em cativeiro para promover a coloração dos mesmos. O objetivo foi comparar o desempenho das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* na formação de biomassa e astaxantina. Foram analisadas as paredes celulares das células das cepas mutante PR-18 e selvagem oriundas dos cultivos com glucose, sacarose e caldo de cana e avaliadas as composições primárias de monossacarídeos das células obtidas do cultivo em caldo de cana. A cepa mutante PR-18 apresentou o melhor desempenho na formação de biomassa e astaxantina nos meios com glucose, sacarose e caldo de cana comparada à cepa selvagem nos cultivos em frascos. Os valores de concentração celular máxima (X_{max}) e concentração volumétrica máxima de astaxantina (P_{max}) obtidos no cultivo com caldo de cana foram de 7,21 g.L⁻¹ e 2,18 mg.L⁻¹ para a cepa mutante PR-18 e 6,53 g.L⁻¹ e 1,86 mg.L⁻¹ para a cepa selvagem, respectivamente. As cepas mutante PR-18 e selvagem não apresentaram diferenças entre si nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, porém, a comparação das médias dos valores das espessuras das paredes celulares obtidas por morfometria sugeriu uma parede celular com maior espessura no cultivo com caldo de cana. Por essa razão, as cepas foram cultivadas em biorreator por processo descontínuo alimentado utilizando o meio de cultivo de baixo custo contendo caldo de cana e uréia, e, considerando-se os valores de concentração celular máxima (X_{max}) e concentração volumétrica máxima de astaxantina (P_{max}), sendo 5,01 g.L⁻¹ e 22,29 mg.L⁻¹ para a cepa mutante PR-18 e 5,41 g.L⁻¹ e 27,75 mg.L⁻¹ para a cepa selvagem, respectivamente, e produtividade em biomassa (P_X), produtividade em astaxantina (P_P) e fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e substrato em astaxantina ($Y_{P/S}$), a cepa selvagem apresentou o melhor desempenho tanto no que se refere ao crescimento celular quanto à formação de astaxantina em relação à cepa mutante PR-18. Os resultados da composição de monossacarídeos mostram a maior diferença nos percentuais para a ramnose em extração com água quente, sendo 84,75 mol% para a cepa mutante PR-18 e 10,99 mol% para a cepa selvagem.

Palavras-chaves: *Phaffia rhodozyma*, astaxantina, parede celular, caldo de cana, microscopia eletrônica de transmissão, morfometria.

ABSTRACT

The yeast *Phaffia rhodozyma* produces astaxanthin as its main carotenoid pigment, conferring it commercial interest. Astaxanthin is found naturally in the marine environment and it is responsible for the characteristic coloration of certain animals, including salmonids, crustaceans and shrimps. The Food and Drug Administration has authorized the use of the yeast *Phaffia rhodozyma* as an additive in feed for farmed fishes to promote their coloration. The objective of this study was to compare the performance of the mutant PR-18 and a wild strain of the yeast *Phaffia rhodozyma* in biomass and astaxanthin formation. The cell walls of the mutant PR-18 and wild strain from cultures with glucose, saccharose and sugar cane juice were analyzed and the primary monosaccharide composition was evaluated in cultures obtained with sugar cane juice. The mutant strain PR-18 showed better performance in media containing glucose, saccharose and sugar cane juice when compared to the wild strain in flask cultures. The values of maximum cellular concentration (X_{\max}) and maximum astaxanthin volumetric concentration (P_{\max}) obtained in the culture with sugar cane juice was of 7.21 g.L⁻¹ and 2.18 mg.L⁻¹ for the mutant strain PR-18 and 6.53 g.L⁻¹ and 1.86 mg.L⁻¹ for the wild strain, respectively. The mutant PR-18 and wild strain didn't show significant differences in the images obtained with transmission electronic microscopy, although, a comparison of the averages of cell wall thickness obtained by morphometric analysis suggested a larger cell wall in extension in the culture with sugar cane juice. For this reason, the strains were cultivated by fed-batch process in bioreactor containing low-cost culture media containing sugar cane juice and urea. The values of maximum cellular concentration (X_{\max}) and maximum astaxanthin volumetric concentration (P_{\max}) were 5.01 g.L⁻¹ and 22.29 mg.L⁻¹ for the mutant strain PR-18, and 5.41 g.L⁻¹ and 27.75 mg.L⁻¹ for the wild strain, respectively. In terms of productivity in biomass (P_X), productivity in astaxanthin (P_P) and conversion factors of substrate in biomass ($Y_{X/S}$) and substrate in astaxanthin ($Y_{P/S}$), the wild strain showed the best performance for cellular growth as well as for astaxanthin formation in relation to the mutant strain PR-18. The results of monosaccharide composition showed the biggest difference in the percentuals for ramnose in extraction with hot water, being 84.75 mol% for the mutant strain PR-18 and 10.99 mol% for the wild strain.

Key-words: *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, cell wall, sugar cane juice, electronic transmission microscopy, morphometry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA ASTAXANTINA.....	19
FIGURA 2 – CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (g.L ⁻¹) PELAS CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”) E SELVAGEM (“b”) DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO (h), NOS MEIOS CONTENDO OS SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA	54
FIGURA 3 – VARIAÇÃO DO pH E FORMAÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA PELAS CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”, “b” E “c”) E SELVAGEM (“d”, “e” E “f”) DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , NOS MEIOS CONTENDO GLUCOSE (“a” E “d”), SACAROSE (“b” E “e”) E CALDO DE CANA (“c” E “f”), EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO (h)	56
FIGURA 4 - IMAGENS DE CORTES ULTRA-FINOS DE CÉLULAS PROVINDAS DO CULTIVO EM GLUCOSE DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”) E SELVAGEM (“b”), OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM AUMENTO DE 20.000 VEZES	64
FIGURA 5 - IMAGENS DE CORTES ULTRA-FINOS DE CÉLULAS PROVINDAS DO CULTIVO EM SACAROSE DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”) E SELVAGEM (“b”), OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM AUMENTO DE 20.000 VEZES	64
FIGURA 6 - IMAGENS DE CORTES ULTRA-FINOS DE CÉLULAS PROVINDAS DO CULTIVO EM CALDO DE CANA DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”) E SELVAGEM (“b”), OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM AUMENTO DE 20.000 VEZES.....	66
FIGURA 7 - MÉDIAS DOS VALORES DA ESPESSURA DA PAREDE CELULAR DAS CÉLULAS DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , CEPA MUTANTE PR-18, CULTIVADAS NOS MEIOS COM SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, OBTIDAS POR MORFOMETRIA.....	68
FIGURA 8 - MÉDIAS DOS VALORES DA ESPESSURA DA PAREDE CELULAR DAS CÉLULAS DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , CEPA SELVAGEM, CULTIVADAS NOS MEIOS COM SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, OBTIDAS POR MORFOMETRIA.....	69
FIGURA 9 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS (g.L ⁻¹) E FORMAÇÃO DE BIOMASSA (g.L ⁻¹) E ASTAXANTINA (mg.L ⁻¹) PELAS CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”) E SELVAGEM (“b”) DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO, NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES MÉDIOS DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) E ASTAXANTINA ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) PARA AS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> NOS MEIOS CONTENDO GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, NO FINAL DO CULTIVO	61
TABELA 2 – VALORES MÉDIOS DE FATORES DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA (g.g^{-1}) E EM ASTAXANTINA (mg.g^{-1}) PARA AS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> NOS MEIOS CONTENDO GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, EM 96 HORAS DE CULTIVO	62
TABELA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS VALORES DE ESPESSURA DE PAREDE CELULAR DAS CÉLULAS DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> , CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM, QUANDO CULTIVADAS NOS SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA.	70
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) E ASTAXANTINA ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) E FATORES DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA (g.g^{-1}) E EM ASTAXANTINA (mg.g^{-1}) PARA AS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO, NOS PROCESSOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS	73
TABELA 5 – COMPOSIÇÃO PRIMÁRIA DE MONOSSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES DAS PAREDES CELULARES DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> CULTIVADAS EM MEIO COM CALDO DE CANA.	75

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

d.i. – diâmetro interno

p.a. – pró-análise

p/p – peso por peso

p/v – peso por volume

q.s.p. – quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

v/v – volume por volume

vvm – volume de ar por volume de meio por minuto

YM – Yeast Media

YPG – Yeast Peptone Glucose Media

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	14
II. REVISÃO DA LITERATURA	17
1 PIGMENTOS CAROTENÓIDES	18
2 ASTAXANTINA	18
3 LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	20
3.1 APLICAÇÃO DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i> EM RAÇÃO ANIMAL	22
3.2 CULTIVO DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	24
3.3 PAREDE CELULAR	30
III. OBJETIVOS	32
1 OBJETIVO PRINCIPAL	33
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	34
1 MICRORGANISMO	35
2 MATÉRIA-PRIMA	35
2.1 CALDO DE CANA “ <i>IN NATURA</i> ”	35
2.2 REAGENTES	35
3 MEIOS DE CULTIVO	36
3.1 MEIO DE MANUTENÇÃO	36
3.2. MEIO DE CULTIVO CONTENDO α -D-GLUCOSE OU SACAROSE	36
3.3 MEIO DE CULTIVO CONTENDO CALDO DE CANA <i>IN NATURA</i>	36
3.4 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	37
4 CULTIVO EM FRASCOS DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	37
4.1 PREPARO DAS SUSPENSÕES DOS MICRORGANISMOS	37
4.2 CULTIVO EM FRASCOS	38
4.3 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS	38
5 MÉTODOS ANALÍTICOS	39
5.1 DETERMINAÇÃO DE pH	39
5.2 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS	39
5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS.mL ⁻¹	39
5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	39
5.5 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASTAXANT	
6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E MORFOMETRIA	41
7 CULTIVO EM BIORREATOR DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	43

	13
8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	46
8.1 PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA.....	46
8.2 PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA.....	46
8.3 FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA	47
8.4 FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM ASTAXANTINA	47
9 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS PAREDES CELULARES	48
9.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	49
9.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR.....	49
9.3 REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ETAPA DE HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL	50
9.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PRIMÁRIA DE MONOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA	50
10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
1 CALDO DE CANA <i>IN NATURA</i>	53
2 CULTIVO EM FRASCOS DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	53
2.1 PRODUTIVIDADES E FATORES DE CONVERSÃO	60
3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E MORFOMETRIA	62
4 CULTIVO EM BIORREATOR DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA <i>Phaffia rhodozyma</i>	71
5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PRIMÁRIA DE MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS PAREDES CELULARES	75
VI. CONCLUSÕES.....	78
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

O microrganismo *Phaffia rhodozyma* foi isolado por Herman Jan Phaff por volta de 1970 e, após a descoberta do principal pigmento carotenóide produzido pela levedura, a astaxantina, percebeu-se um interesse comercial pela mesma, pois a astaxantina é naturalmente encontrada no ambiente marinho e promove as cores vívidas de certos animais, incluindo salmão, lagostas, caranguejos e camarões (JOHNSON, 2003).

A astaxantina pode ser produzida comercialmente por síntese química, fermentação ou isolada em pequenas quantidades providas de fontes naturais (LEE; SCHMIDT-DANNERT, 2002). Em 2000, o órgão americano de regulamentação Food and Drug Administration autorizou o uso da levedura *Phaffia rhodozyma* na forma de células secas e inativas, não patogênicas e não tóxicas, como aditivo à alimentação de peixes para promover coloração dos animais (FDA, 2000).

No Brasil, em 2005, foram produzidas cerca de 1 milhão de toneladas de pescado, valor crescente em dez anos, já que em 1996 a produção era de aproximadamente 700 mil toneladas (SEAP, 2005). Atualmente, existe um incentivo ao aumento da produção de pescados no Brasil por meio de projetos da Secretaria Especial de Agricultura e Pesca. Assim, é oportuno o estudo da otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* empregando meios de baixo custo.

O cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma*, cepas selvagens e mutantes, tem sido descrito por diversos autores utilizando diferentes substratos como: caldo de cana bruto (FONTANA, et al., 1996; BONFIM, 1999; MORIEL, 2004), bagaço de cana despolimerizado, farinha de soja, fécula de batata, vinhaça (FONTANA, et al., 1996; BONFIM, 1999), resíduo da hidrólise enzimática de componentes da madeira *Pinus pinaster* (hemicelulose) (PARAJÓ, et al., 1996), resíduo da destilação de milho (BON; LEATHERS; JAYASWAL, 1997), glicerol (KUSDIYANTINI, et al., 1998), melaço de cana (AN; JANG; CHO, 2001), resíduo bruto de leite de coco (DOMIGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUNOZ, 2004), resíduos da mostarda (TINOI; RAKARIYATHAM; DEMING, 2006), extratos das plantas *Perilla frutescens* e *Allium fistulosum* (KIM, et al., 2007) e suco de abacaxi (JIRASRIPONGPUN, et al., 2008). Há, ainda, estudos para obtenção de novas cepas selvagens (LIBKIND, et al., 2008; WEBER, et al., 2008) e o desenvolvimento de cepas mutantes (LIU, et al., 2008).

No Brasil, o caldo de cana pode ser considerado um potencial meio de baixo custo para o cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma*, pois a produção da cana-de-

açúcar chegou a quase 500 milhões de toneladas na safra de 2007/2008 (BRASIL, 2008). Em setembro de 2008, no estado do Paraná, a cotação da cana-de-açúcar é de cerca de 30 reais por tonelada (AGROLINK, 2008).

Entretanto, a utilização da levedura *Phaffia rhodozyma* como suplemento na alimentação animal é dificultada pela rígida composição da parede celular da mesma, o que reduz a biodisponibilidade da astaxantina mesmo que se utilizem métodos de lise enzimática e mecânica (CALO; GONZALEZ, 1995). O aumento da disponibilidade da astaxantina por meio do conhecimento das características da parede celular torna-se relevante no cultivo das cepas selvagem e mutante da levedura *Phaffia rhodozyma*, visando, preferencialmente, a utilização da célula intacta.

O presente trabalho tem por objetivo comparar o desempenho das cepas mutante PR-18 e selvagem ATCC 24202 da levedura *Phaffia rhodozyma* na formação de biomassa e astaxantina quando cultivadas em meio de baixo custo contendo caldo de cana e identificar diferenças na composição primária de monossacarídeos das paredes celulares.

II. REVISÃO DA LITERATURA

1 PIGMENTOS CAROTENÓIDES

Os carotenóides compõem uma classe natural de pigmentos lipossolúveis, geralmente encontrados em plantas, algas e bactérias fotossintéticas, os quais possuem importante papel no processo fotossintético. Também são encontrados em bactérias não fotossintetizantes, leveduras e fungos (mofos e bolores), protegendo tais organismos de danos gerados pela luz e oxigênio (NI, et al., 2005).

Os animais não sintetizam carotenóides, mas muitos são coloridos devido à absorção de tais pigmentos pela dieta. Alguns exemplos são os flamingos, que contêm cetocarotenóides nas penas vermelho-rosadas, e os peixes dourado e salmão, que apresentam a astaxantina na pele e na carne. Em animais marinhos invertebrados, a coloração é devido a complexos caroteno-proteína nos quais a coloração vermelho-alaranjada do carotenóide livre, usualmente astaxantina, se altera na direção de matizes como o azul púrpura ou verde. Assim, a lagosta, azulada quando viva, torna-se vermelha quando cozida devido ao carotenóide astaxantina ser liberado a partir da desnaturação da proteína carreadora (BRITTON; LIAAEN-JENSEN; PFANDER, 1995)

Em 2002, foi descrito que apenas oito dos aproximadamente 700 carotenóides de ocorrência natural podiam ser produzidos sinteticamente ou em escala industrial, como β,β -caroteno, (3R-3'R)-zeaxantina, cantaxantina e astaxantina (ERNST, 2002).

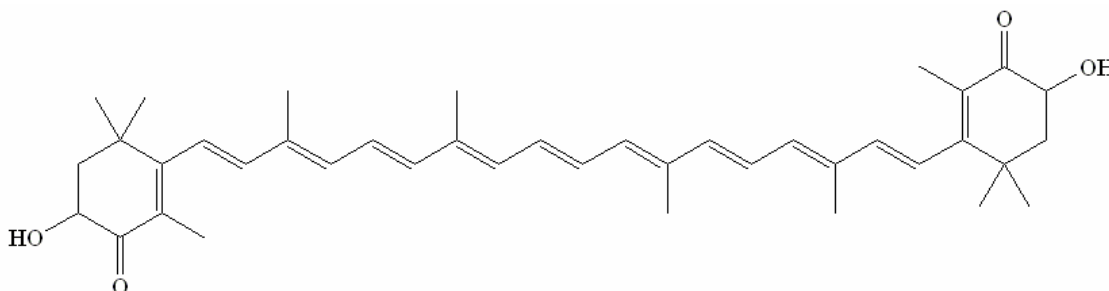
Os pigmentos carotenóides são utilizados comercialmente como corantes em alimentos, suplementos de ração animal, cosméticos e com propósitos farmacêuticos (VERDOES, et al., 2003).

De acordo com os estudos de mercado publicados em 2008 pela Business Communications Company, em 2007 o comércio global de carotenóides chegou a 766 milhões de dólares e espera-se que a marca de 919 milhões de dólares seja superada até 2015, com taxa de crescimento anual de 2,3%. Atualmente, o carotenóide de maior consumo é o β -caroteno, com 32% do mercado, e na segunda posição está a astaxantina, com 28%. Estima-se que os valores comercializados para a astaxantina atinjam 253 milhões de dólares em 2015, o que representa um crescimento de 1,8% ao ano (BCC, 2008).

2 ASTAXANTINA

A astaxantina (3,3'-diidroxib- β -caroteno-4,4'-diona) é um oxicarotenóide com fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$ e peso molecular de 596,86 mol (GODWIN, 1992). Este pigmento é insolúvel em solução aquosa e na maioria dos solventes, mas pode ser dissolvida à temperatura ambiente em diclorometano ($\sim 30 \text{ g.L}^{-1}$), clorofórmio ($\sim 10 \text{ g.L}^{-1}$), acetona ($\sim 0,2 \text{ g.L}^{-1}$), dimetilsulfóxido ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) e outros solventes apolares (JOHNSON; AN, 1991).

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA ASTAXANTINA



FONTE: (GODWIN, 1992).

A astaxantina possui dois carbonos assimétricos nas posições 3 e 3', e pode existir em quatro configurações, incluindo os enantiômeros 3S,3'S e 3R,3'R e formas meso 3R3'S e 3'R,3S. Todas essas configurações podem ser encontradas em fontes naturais de astaxantina, dentro de uma mesma espécie ou em espécies diferentes (JOHNSON; AN, 1991).

Em salmões selvagens foram encontradas todas as configurações enantioméricas e meso da astaxantina, o que reflete a capacidade de pigmentação de todas as configurações (JOHNSON; AN, 1991).

A astaxantina pode ser produzida comercialmente por síntese química, fermentação ou isolada em pequenas quantidades providas de fontes naturais (LEE; SCHMIDT-DANNERT, 2002). As empresas Hoffmann-La Roche e BASF obtêm a astaxantina por síntese química (ERNST, 2002). Grynbaum e colaboradores (2005) afirmaram que a síntese química é o processo mais utilizado para a produção comercial de astaxantina, porém, por serem reações complexas e dependentes de catalisadores não específicos são formados vários subprodutos, o que onera o processo. Relataram, ainda, que o processo de obtenção do carotenóide pela extração a partir de crustáceos como *Euphasia superba* (krill) ocasiona problemas ambientais em virtude dos mesmos fazerem parte da cadeia alimentar de vários seres marinhos. Johnson e An (2001) indicam que a bioprodução de astaxantina

pode ser realizada por uma variedade de organismos capazes de sintetizar o pigmento, como, por exemplo, a microalga *Haematococcus pluvialis*, as bactérias *Agrobacterium auranticum*, *Mycobacterium laticola* e *Brevibacterium* spp. e a levedura *Phaffia rhodozyma*.

Algumas empresas, como Cyanotech (CYANOTECH, 2008) e Aquasearch (OLAIZOLA, 2000), produzem astaxantina utilizando a alga *Haematococcus pluvialis*. Outras como Igene Biotechnology (AQUASTA, 2007) e Archer Daniels Midland (ADM, 2008), produzem astaxantina utilizando a levedura *Phaffia rhodozyma*.

A astaxantina apresenta propriedades antioxidantes, as quais são devidas a sua estrutura especial, com 11 duplas ligações carbono-carbono conjugadas. Tal propriedade da astaxantina é 10 vezes maior que a do β -caroteno e até 500 vezes maior que a da vitamina E. Entretanto, em função de ser uma molécula altamente saturada, a astaxantina pode ser facilmente degradada pela luz e calor, o que pode causar a perda das propriedades biológicas (CHEN, et al., 2007).

É possível encontrar no mercado a astaxantina para consumo humano em formas de cápsulas ou tabletes, em concentrações que variam de 1 mg a 4 mg, as quais indicam serem capazes de conferir atividade antioxidante e aumentar a imunidade, energia, força cardiovascular e a proteção natural da pele. Os preços variam de 10 a 30 dólares para embalagens contendo 60 unidades, de acordo com a marca e concentração (CALIBEX, 2008).

Chen e colaboradores (2007) utilizaram o composto β -ciclodextrina na tentativa de modificar propriedades físicas e químicas da astaxantina, como aumentar a solubilidade e estabilidade. Em se tratando de solubilidade, o complexo β -ciclodextrina e astaxantina não apresentou grande vantagem em relação à astaxantina pura, já no que se refere à estabilidade, tanto em presença de luz quanto de calor, o complexo foi significativamente mais estável que o carotenóide puro.

3 LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

Isolada no início dos anos 70 a partir de exudatos de árvores montanhosas, a levedura *Phaffia rhodozyma* foi inicialmente estudada por Herman Phaff, Martin Miller, Minoru Yoneyama e Masumi Soneda (JOHNSON; AN, 1991). Phaff e

colaboradores perceberam que se tratava de um novo gênero de levedura, ao qual denominaram “*Rhodozyma montanae*” em função da coloração vermelho-alaranjada e do local em que foi obtida. A falta de uma determinação em latim, como é exigido pelas regras do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, permitiu a Miller, Yoneyama e Soneda (1976) a mudança do gênero para *Phaffia* em homenagem a Herman Phaff.

A levedura *Phaffia rhodozyma* se mostrou uma levedura incomum por ser a única espécie conhecida contendo carotenóide com capacidade de fermentar glucose vigorosamente, até então só haviam sido descritas cepas de leveduras contendo carotenóides que apresentavam metabolismo estritamente respiratório (MILLER; YONEYAMA; SONEDA, 1976).

O gênero *Phaffia* é caracterizado por células vegetativas elípticas, as quais se apresentam isoladas, em pares ou formando cadeias curtas. Não possuem micélio verdadeiro, porém podem apresentar pseudomicélio rudimentar (MILLER; YONEYAMA; SONEDA, 1976) e pertence à classe dos Basidiomicetos (BISBY, et al., 2008).

Em 1995, Golubev descreveu a existência de conjugação induzida por poliálcoois entre a célula mãe e seu brotamento (pedogamia), ocorrida em algumas cepas isoladas na Rússia, e propôs um novo gênero à forma teleomórfica *Xanthophyllomyces dendrorhous* Golubev sp nov. A levedura *Phaffia rhodozyma* passou a ser considerada a forma anamórfica de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Entretanto, em 1999, Fell e Blatt citaram Kucsera e colaboradores (1995)¹ ao sugerirem que *Phaffia rhodozyma* e *Xanthophyllomyces dendrorhous* representavam espécies distintas, e apresentaram resultados baseados em técnicas de biologia molecular para comprovar a afirmação. Desta forma, concluíram que a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* pode ser caracterizada por eventos de deleção ou inserção na região do espaço intergênico ao ser comparada com *Phaffia rhodozyma*. Apesar dessa consideração, não há total consenso sobre a diferença entre os microrganismos. Em 2007, foram realizados novos estudos de biologia molecular, os quais se mostraram não conclusivos quanto à diferença entre as espécies, já que admitem a possibilidade dos eventos de deleção e inserção serem atribuídos a diferenças intraespecíficas (LIBKIND, et al., 2007).

Em 2008, foi descrita uma nova cepa selvagem da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a qual foi depositada no cepário da Universidade

¹ KUCSERA, J., PFEIFFER, I., FERENCZY, I. Occurrence of petite mutation in *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiol Immunol Hung*, v.42, p.134–135, 1995.

de Conceção, Chile, como *Xanthophyllomyces dendrorhous* sp. MIC-CONC-2006-762. A cepa foi isolada das folhas de *Eucalyptus globulus* e analisada por biologia molecular. As seqüências de DNA não mostraram homologia com àquelas depositadas no GenBank, sugerindo que é uma nova espécie (WEBER, et al., 2008). Também em 2008 foram descritas as cepas selvagens *Xanthophyllomyces dendrorhous* CRUB 853, isolada de estômatos de *Cyttaria hariatii* e CRUB 1149, isolada de águas do lago Ilón, região da Patagônia, Argentina. Ambas as cepas apresentaram diferenças genéticas em relação às demais cepas depositadas em coleções oficiais (LIBKIND, et al., 2008).

A característica que melhor define a levedura *Phaffia rhodozyma* é a sua composição de carotenóides. Estudos de Andrewes, Phaff e Starr (1976) concluíram que a astaxantina é o composto majoritário, correspondendo a 83,87% da mistura total de carotenóides. O mesmo grupo de pesquisadores identificou a configuração da astaxantina isolada da levedura como 3R,3'R, ao contrário da isolada de outras fontes naturais, como da alga *Haematococcus pluvialis*, a qual possui configuração 3S,3'S (ANDREWES; STARR, 1976).

O órgão americano de regulamentação Food and Drug Administration (FDA) autorizou a utilização da levedura *Phaffia rhodozyma* como aditivo na alimentação de peixes para promover a coloração dos animais, e deve ser administrada na forma de células secas e inativas, não patogênicas e não tóxicas. O FDA indica que o uso não deve exceder 72 g por tonelada de peixes alimentados e a preparação do aditivo deve seguir normas que garantam a segurança no produto final (FDA, 2000).

3.1 APLICAÇÃO DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma* EM RAÇÃO ANIMAL

Dados de literatura comprovam a capacidade da levedura *Phaffia rhodozyma* em fornecer a pigmentação vermelho-alaranjada aos animais, quando adicionada à ração dos mesmos.

Os primeiros relatos do emprego da levedura *Phaffia rhodozyma* na ração animal mostram que pesquisadores alimentaram por 43 dias trutas (*Salmo gairdneri*) com uma dieta contendo 15% da levedura. Após as análises foi observado que as

trutas apresentavam, além da pigmentação, um ganho de peso de cerca de 50% em relação à dieta controle (JOHNSON; CONKLIN; LEWIS, 1977).

Akiba e colaboradores (2000) demonstraram que a rígida parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma* influenciou na pigmentação da gema de ovo de frangos alimentados com este microrganismo como fonte de astaxantina. Nas análises realizadas, apenas 40,7% do carotenóide presente na levedura foi detectado. No entanto, com o emprego do pigmento sintético cantaxantina observou-se 4 a 5 vezes mais eficiência na pigmentação da gema do ovo em relação à astaxantina.

Posteriormente, o mesmo grupo analisou a pigmentação da carne das aves alimentadas com a levedura *Phaffia rhodozyma*. Os resultados indicaram que as aves alimentadas com células íntegras não apresentaram diferenças significativas na pigmentação, entretanto, a levedura após ruptura mecânica da parede celular aumentou consideravelmente a coloração avermelhada da carne. Dessa forma, concluíram que, ao aumentar a disponibilidade da astaxantina pela quebra da parede celular, a levedura *Phaffia rhodozyma* pode ser considerada uma boa fonte de pigmento para o aumento do valor comercial da carne de frango (AKIBA; SATO; TAKAHASHI, 2001).

Storebakken e colaboradores (2004a) verificaram o efeito da ruptura enzimática na parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*. Os produtos da hidrólise enzimática da parede celular da levedura obtidos em três diferentes graus de ruptura, 45%, 70% e 95%, foram adicionados à alimentação das trutas. As trutas, que possuíam peso inicial de cerca de 500 g, foram alimentadas por 92 dias e aproximadamente dobraram de peso durante o experimento. Comprovou-se que quanto maior o grau de ruptura da parede celular, maior a concentração de astaxantina detectada na carne do animal (STOREBAKKEN, et al., 2004b).

No Brasil, recentemente Passos (2007) alimentou camarões brancos (*Litopenaeus vannamei*) com três diferentes fontes de astaxantina, contendo na dieta 100 ppm do pigmento em todas as situações. Utilizou a fonte comercial NatuRose®, proveniente da extração de astaxantina da microalga *Haematococcus pluvialis*, e as fontes naturais levedura *Phaffia rhodozyma*, cepa selvagem ATCC 24202, e a microalga *Chlorella vulgaris*. A dieta contendo a fonte comercial NatuRose® (Cyanotech – Hawaii, USA), apresentou a melhor pigmentação dos camarões ($14,5 \pm 3,58$ mg/Kg de peso seco), seguida da alimentação contendo célula íntegra da levedura *Phaffia rhodozyma* ($11,82 \pm 0,92$ mg/Kg de peso seco), o que comprova a eficiência do microrganismo para pigmentação neste experimento,

já que visualmente a coloração se mostrava satisfatória, questão importante na aceitação e no comércio do crustáceo.

3.2 CULTIVO DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

Os últimos dados disponibilizados pelo governo brasileiro, Secretaria Especial de Agricultura e Pesca, datam de 2005 e indicam que, naquele ano, o Brasil produziu cerca de 1 milhão de toneladas de pescado, valor crescente em dez anos, já que, em 1996 a produção era de aproximadamente 700 mil toneladas (SEAP, 2005). Atualmente, existe um incentivo ao aumento da produção de pescados no Brasil por meio de projetos da Secretaria Especial de Agricultura e Pesca. Assim, é oportuno o estudo da otimização da produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* empregando meios de baixo custo.

Fontana e colaboradores (1996) utilizaram diversos meios de cultivo de baixo custo, como caldo de cana bruto, bagaço de cana despolimerizado, farinha de soja, fécula de batata e açúcar mascavo para o cultivo em frascos da cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*. Os resultados obtidos indicaram que há possibilidade do uso da cana-de-açúcar e dos meios contendo amiláceos hidrolisados, especialmente quando se adiciona uréia a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ como fonte de nitrogênio, em comparação a outras fontes como proteose peptona, resíduo de soja e raspas de couro animal, pois gera as maiores formações de biomassa, $5,4 \text{ g.L}^{-1}$ e astaxantina, $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$.

Fang e Chiou (1996) realizaram experimentos em frascos com a cepa mutante CHU-FS501 da levedura *Phaffia rhodozyma*, obtida por exposição ao agente mutagênico *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina, para a assimilação de fontes de nitrogênio como extrato de carne, hidrolisado de caseína, nitrato de potássio e extrato de levedura, em comparação com a peptona. Foi observada a maior concentração volumétrica de astaxantina ($6,72 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) quando se utilizou a peptona, e para o crescimento celular, a melhor fonte de nitrogênio relatada foi o extrato de carne, com $7,09 \text{ g.L}^{-1}$, em relação à peptona, $6,43 \text{ g.L}^{-1}$. Considerando-se a concentração volumétrica em astaxantina obtida no cultivo com extrato de carne, $4,79 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, os autores indicaram a peptona como a fonte de melhor desempenho geral. No caso dos testes de assimilação de diferentes fontes de carbono, a produção de astaxantina foi maior quando se utilizou o cultivo em glucose,

6,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação à fucose, 5,91 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ melaço, 3,52 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, rafinose, 2,48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e sacarose, 5,59 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e, apesar do crescimento celular com glucose ter sido de 6,43 g.L^{-1} , menor do que o obtido para o cultivo em melaço, 7,21 g.L^{-1} , o meio contendo glucose teve o melhor desempenho geral considerando-se a formação de astaxantina.

Parajó e colaboradores (1996) utilizaram como fonte de carbono a hemicelulose obtida por hidrólise enzimática de componentes da madeira *Pinus pinaster*. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas no aumento da concentração volumétrica de astaxantina em relação ao meio de cultivo contendo glucose como fonte de carbono, sendo de 1,3 mg.L^{-1} a 2,1 mg.L^{-1} para o cultivo em hemicelulose e 1,3 mg.L^{-1} a 10,2 mg.L^{-1} para a glucose, porém concluiu que se tratava de um meio de baixo custo passível de ser utilizado no cultivo em frascos da cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*.

O cultivo realizado em frascos com resíduo da destilação do milho a 70%, um meio complexo contendo diversos nutrientes, foi descrito como favorável à produção de astaxantina pela cepa mutante JB2 da levedura *Phaffia rhodozyma* em relação à cepa selvagem, tendo sido obtido 1540 μg de astaxantina por grama de célula seca e 380 μg de astaxantina por grama de célula seca, respectivamente (BON; LEATHERS; JAYASWAL, 1997).

Yamane (1997b) indicaram a resposta da levedura *Phaffia rhodozyma* para a produtividade em astaxantina em função da concentração inicial da fonte de carbono. Os pesquisadores observaram que, no cultivo em frascos, a levedura apresentou decréscimo na produção da astaxantina com o aumento da concentração da glucose. Isso ocorreu devido à dificuldade na manutenção da concentração de oxigênio dissolvido, já que no cultivo em biorreator a produtividade em astaxantina se manteve em aproximadamente 0,54 $\mu\text{g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ nas concentrações iniciais de 10 a 80 g.L^{-1} de glucose. Os resultados sugerem que para se manter a alta produtividade em astaxantina são necessários elevados níveis de oxigênio para reprimir o efeito Crabtree, ou seja, metabolismo fermentativo da levedura em condições aeróbias quando se aumenta a concentração da glucose.

Em cultivos da levedura *Phaffia rhodozyma* utilizando xilose, piruvato e acetato houve redução tanto na taxa de crescimento quanto na produção de pigmentos. Apenas no cultivo em meio contendo etanol 0,5 g% a cepa selvagem apresentou maior produtividade em astaxantina, sendo de 580 μg por grama de célula seca, mas com crescimento celular de apenas 1,5 g.L^{-1} , ou seja,

significativamente menor que no cultivo em glucose, $5,7 \text{ g.L}^{-1}$ (YAMANE, et al., 1997a).

Kusdiyantini e colaboradores (1998) reportaram a assimilação do glicerol como fonte de carbono para a cepa mutante de *Phaffia rhodozyma* PR 190, obtida da indústria de bebidas Pernod Ricard, França. O estudo demonstrou que essa cepa PR 190 assimila o glicerol e apresenta taxas de crescimento específico e produção de astaxantina de $0,24 \pm 0,02 \cdot \text{h}^{-1}$ e $0,09 \pm 0,01 \cdot \text{h}^{-1}$, com a melhor concentração volumétrica de astaxantina, $33,7 \text{ mg.L}^{-1}$, observada em 168 horas de cultivo.

Com base nos resultados do trabalho de Kusdiyantini e colaboradores (1998) verifica-se que há a possibilidade do uso do glicerol, um resíduo do biodiesel, como fonte de carbono para o cultivo de cepas mutantes da levedura *Phaffia rhodozyma*.

Palágyi, Ferenczy e Vagvolgyi (2001) testaram assimilação de 99 diferentes fontes de carbono em onze cepas da levedura *Phaffia rhodozyma*, sendo as cepas selvagens ATCC 24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24230, ATCC 24261, CBS 5905 (também denominada ATCC 24202), CBS 5908, CBS 6938, CCY 77-1-1, e as cepas mutantes W/IMP-UB e Z/IMP-UB. O estudo mostrou que as fontes de carbono D-xilose, D-glucose, D-manose, D-frutose, L-arabinose, L-xilose, sacarose, D-maltose, D-celobiose, D-rafinose, D-melezitose, amido, citidina, ácido 2-ceto-D-glucônico, ácido L-málico, etanol, β -metil-D-glucosídeo, arbutina, salicina, ácido oxalacético, ácido D-glucônico, lactona, ácido acético e trealose são assimiladas por todas as cepas.

Concluíram, ainda, que algumas fontes de carbono não são assimiladas por nenhuma das cepas, como: D-ribose, D-galactose, L-ramnose, lactose, D-melibiose, xilana, dextrana, inulina, glicerol, i-eritritol, galactitol, ribitol, mio-inositol, xilitol, glicina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-serina, L-treonina, L-asparagina, L-cisteína, L-tirosina, L-lisina, L-arginina, L-histidina, β -alanina, L-ornitina, L-citrulina, uracila, citosina, tiamina, adenosina, dihidroxiacetona, γ -butirolactona, vanilina, ácido gálico, ácido L-hidroxibutírico, β -metil-D-galactosídeo, metil-D-xilosídeo, metil- α -D-manopiranosídeo, ácido cetisovalérico, ácido protocatechuico, ácido ascórbico, D-glucosamina, ácido fumárico, ácido gentísico, ácido DL-isocítrico, metanol, ácido orótico, pectina, ácido tartárico e α -cetoglutarato. O estudo também demonstrou que a cepa selvagem ATCC 24202 assimila normalmente D-arabinose, glicerol-1-monoacetato, ácido glucônico, inosina, D-manitol, L-prolina, ácido pirúvico, D-sorbitol e L-sorbose e assimila fracamente o ácido L-glutâmico, ácido 5-ceto-D-glucônico, ácido L-lático e

uridina. O trabalho não citou a formação de astaxantina pelas cepas (PALÁGYI; FERENCZY; VAGVOLGYI, 2001).

An, Jang e Cho (2001) empregaram em cultivo em frascos o melaço de cana de banda negra a 5% suplementado com sulfato de amônio, composto muito usado na Coréia como fonte de nitrogênio para o cultivo de leveduras, porém observaram que a cepa mutante 2A2N da levedura *Phaffia rhodozyma* incorporou pigmentos escuros devido à fonte de nitrogênio, o que inviabiliza a questão comercial do microrganismo. Os autores também utilizaram o melaço suplementado com fosfato de potássio, que levou a um decréscimo na produção da biomassa; já a suplementação com uréia aumentou significativamente a produção celular. Nos cultivos em escala piloto de 100 L o melhor resultado, 36 g.L⁻¹, foi obtido com o meio contendo melaço suplementado com uréia e fosfato de sódio.

Dominguez-Bocanegra e Torres-Muñoz (2004) utilizaram o resíduo bruto de leite de coco sem adição de nutrientes no cultivo em frascos da cepa mutante R1 da levedura *Phaffia rhodozyma*. Os resultados obtidos em relação ao meio controle YM (glucose 1,0 g%, peptona 0,5 g%, extrato de malte 0,3 g% e extrato de levedura 0,3 g%) mostraram que houve aumento significativo de produção de biomassa e 95% de aumento da produção da astaxantina em relação à cepa selvagem, sendo de 1850 µg de astaxantina por grama de célula seca para a cepa R1 e 850 µg de astaxantina por grama de célula seca para a cepa selvagem.

Moriel e colaboradores (2005) cultivaram a cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202 em meio contendo caldo de cana suplementado com uréia em processos contínuo e descontínuo alimentado em biorreator. Os pesquisadores obtiveram no processo descontínuo alimentado a concentração celular de 303,34 µg de astaxantina por grama de célula seca e 18,75 g.L⁻¹ de biomassa seca, e observaram que, apesar de um aumento na produtividade em biomassa em relação ao processo contínuo, houve redução na concentração celular em astaxantina, a qual foi de 364,59 µg de astaxantina por grama de célula seca para o segundo processo.

A formação da astaxantina pela cepa selvagem da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* TISTR 5730 foi avaliada no cultivo em frascos utilizando-se diferentes meios contendo resíduos da mostarda, incluindo o extrato de resíduo de mostarda, hidrolisado do resíduo da mostarda e precipitado de hidrolisado de resíduo de mostarda em concentrações variando de 0 a 30%. O crescimento do microrganismo e formação da astaxantina dependeram da

concentração inicial dos meios, tendo sido obtidos melhores resultados com o meio contendo precipitado do hidrolisado de resíduo de mostarda a 15%, com 19,6 g.L⁻¹ em biomassa e 25,8 mg.L⁻¹ em concentração volumétrica de astaxantina. Esse meio apresentou concentração volumétrica em astaxantina 11 vezes maior que o meio controle YM, o qual alcançou 2,34 mg.L⁻¹ em 120 horas de cultivo (TINOI; RAKARIYATHAM; DEMING, 2006).

Liu e Wu (2006a) testaram a dupla inclusão do peróxido de hidrogênio a 10 mmol.L⁻¹ em zero e 24 horas de cultivo ao meio contendo 25 g.L⁻¹ de glucose para o cultivo da cepa mutante da levedura *Phaffia rhodozyma* ENM5. A concentração foi definida após avaliação da tolerância celular em diversas concentrações do peróxido de hidrogênio. As concentrações volumétricas de astaxantina e de biomassa seca obtidas nos cultivos contendo o peróxido de hidrogênio foram de 8,9 mg.L⁻¹ e de 6,8 g.L⁻¹, respectivamente. Em relação ao cultivo padrão, sem adição do composto, houve diminuição na concentração em biomassa, sendo o controle de 8,8 g.L⁻¹, porém obteve-se um aumento significativo na formação da astaxantina em que o controle alcançou o valor de 6,3 mg.L⁻¹.

A tentativa de melhorar a produtividade em biomassa e astaxantina não se restringe às alterações de composição de meio e condições físico-químicas. Pesquisadores observaram que a presença de outros fungos no meio de cultivo pode influenciar positivamente os parâmetros biomassa e astaxantina, tendo como melhor resultado a inclusão de *Mucor mucedo* em 30 mg.L⁻¹, que aumentou em 69,81±6,00% a biomassa e em 78,87±4,15% a taxa de carotenóides (WANG; YU; ZHOU, 2006).

Liu e Wu (2006b) utilizaram a cepa mutante *Phaffia rhodozyma* ENM5 obtida por exposição ao *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina para testar a produtividade em biomassa relacionada à aeração. Para isso utilizaram cinco compostos considerados vetores de oxigênio para o cultivo em frascos, ou seja, *n*-hexano, tolueno, *n*-decano, *n*-dodecano e *n*-hexadecano. A adição de 9% de *n*-hexadecano no momento da inoculação foi considerada a situação mais favorável ao crescimento e formação de astaxantina, com 13 e 57,6% de aumento respectivamente, em relação ao controle.

O microrganismo *Xanthophyllomyces dendrorhous* ZJUT46 foi cultivado em fermentador de 2000 L para avaliação dos parâmetros cinéticos durante o escalonamento. Para isso, a cepa foi cultivada inicialmente em frascos de 500 mL, na seqüência foi utilizado o fermentador de 130 L e, por último, o fermentador com capacidade para 2000 L. Os cultivos foram realizados por processo descontínuo

alimentado, sendo a concentração inicial de glucose de 40 g.L^{-1} e a solução de alimentação contendo 50% do mesmo açúcar. O sistema foi alimentado sempre que foi observada a concentração de glucose em torno de 5 g.L^{-1} a fim de reconstituir a concentração de 20 g.L^{-1} . A concentração celular máxima (X_{max}) foi de $17,78 \text{ g.L}^{-1}$, obtida em 108 horas de cultivo. A concentração máxima em astaxantina foi de $39,47 \text{ mg.L}^{-1}$ em 132 horas e a produtividade em astaxantina ao final do processo, 144 horas, foi de $0,30 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Tais resultados foram possíveis com a adoção da estratégia de alteração do pH, que se iniciou em 6,0 e foi mantido nesse valor até 80 horas de cultivo, sendo modificado para 4,0 após esse tempo. Os valores obtidos foram 9% melhores no que se refere à formação de astaxantina, quando comparados aos resultados do processo em que se manteve o pH fixo em 5,0 (HU, et al., 2007).

Kim e colaboradores (2007) obtiveram a cepa mutante *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 por mutagênese química com *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina e relataram que a mesma foi capaz de gerar a concentração volumétrica de astaxantina de aproximadamente $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto a cepa selvagem obteve $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ quando cultivada em meio YM, em cinco dias de cultivo. Os pesquisadores testaram a resposta da cepa mutante G276 na presença de extrato de plantas aos meios de cultivo, sendo que as adições de extratos de *Perilla frutescens* (Perila) a 5% ou *Allium fistulosum* (Cebolinha verde) a 1% foram capazes de gerar concentração volumétrica de astaxantina de cerca de $32,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Em cultivos em biorreator o extrato de *Perilla frutescens* reduziu em dois dias o tempo de cultivo em relação ao meio controle (sem adição de extrato).

Com a intenção de produzir o pigmento astaxantina, uma nova cepa de *Phaffia rhodozyma* sp. ZJB 00010 foi isolada e caracterizada. Na tentativa de obter uma cepa com maior capacidade de gerar o pigmento visando à aplicação industrial, foram realizadas mutações por feixe de íons de baixa energia e a melhor cepa mutante, E5042, foi obtida após cinco mutações sequenciais. Os resultados de cultivos em biorreator de 50 litros com meio contendo glucose a 80 g.L^{-1} demonstraram que a cepa mutante gerou $2512 \mu\text{g}$ de astaxantina por grama de célula seca, em 136 horas de cultivo, enquanto a cepa selvagem atingiu um valor máximo de $1108 \mu\text{g}$ de astaxantina por grama de célula seca em 142 horas de cultivo (LIU, et al., 2008).

Jirasripongpun e colaboradores (2008) avaliaram a produção de biomassa e astaxantina pelas cepas mutantes da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* GM

807, obtida por irradiação gama, e n78, irradiação por nêutrons, em meio contendo suco de abacaxi diluído e suplementado com peróxido de hidrogênio. Foram testadas várias diluições do meio e concentrações do peróxido de hidrogênio, e os resultados obtidos demonstraram que, na diluição de 10% e sem suplementação, o suco de abacaxi é um meio de cultivo capaz de promover o aumento da produção de carotenóides em 65,8% para a cepa mutante GM 807 em relação ao meio YM, alcançando 493 µg por grama de célula seca.

De acordo com a cepa da levedura *Phaffia rhodozyma* empregada e a forma de cultivo, há variação no conteúdo de astaxantina e biomassa. Muitas instituições desenvolvem cepas mutantes, no entanto as mesmas são capazes de produzir maiores quantidades de astaxantina ou de biomassa não concomitantemente, e as células obtidas apresentam dificuldades em tornar a astaxantina disponível para ser absorvida pelos animais. A biodisponibilidade da astaxantina, carotenóide intracelular, é dificultada pela rígida parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*, provavelmente em função da composição de carboidratos da mesma, portanto, se torna importante o conhecimento das características da parede celular deste microrganismo.

3.3 PAREDE CELULAR

As leveduras são envolvidas por uma rígida parede celular que representa cerca de 20 a 25% do peso seco da célula e os estudos de estrutura e composição química geralmente são focados nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Para essas espécies, assim como para outras leveduras que têm sido estudadas, a parede celular consiste em 85% a 90% de polissacarídeos e 10% a 15% de proteínas. O componente de polissacarídeos é formado de uma mistura de manana solúvel em água, glucanas solúvel ou insolúvel em meio alcalino e pequenas quantidades de quitina. A maioria das proteínas é covalentemente ligada às mananas. A proporção desses diferentes componentes varia com as espécies (NGUYEN; FLEET; ROGERS, 1998).

Gad, Itoh e Ikai (1997) tentaram mapear a distribuição de espécies particulares de polissacarídeos de superfície celular de microrganismos vivos e concluíram que o microscópio de força atômica permite esse mapeamento.

O trabalho de revisão de Osumi (1998) descreveu estudos em que foram empregadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão no estudo da parede celular de leveduras por diversos autores. Foram demonstradas proteínas de superfície, alterações de parede celular em presença de antifúngicos, alterações por contato com enzimas, até mesmo elementos estruturais, como microfibrilas, dentre outros.

Em 2007, Piao, Machado e Payne demonstraram que em células selvagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a espessura da parede celular das células mães e células filhas foram idênticas. Já nas células mutantes *sla1-Δshd1* a maioria das células mães apresentou parede celular significativamente mais espessa que as células filhas utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Tradicionalmente, a composição de parede celular tem sido determinada por fracionamento de seus polímeros usando-se uma série de extrações alcalinas a quente ou extrações ácidas a frio (MAGNELLI; CIPOLLO; ABEIJON, 2002).

Bonfim (1999) realizou um “screening” dos polissacarídeos da parede celular da cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202, que indicou a presença de um polímero dominante, o qual se tratava de uma α -glucana observada nas duas frações principais de extração, chegando a 70% do total de polissacarídeos. Observou, ainda, outros açúcares monoméricos como galactose (1,5% a 3,5%), xilose (8% a 9%) e manose (13% a 30%) entre as duas frações de extração. O mesmo estudo sugere a presença de um segmento tipo amilose ou de uma α -D-manana ramificada na parede celular.

Borges (2006) estudou a parede celular de células da cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, ATCC 24202, obtidas de cultivo em meio contendo sacarose. Foram isolados dois polissacarídeos, os quais foram classificados como uma α -D-glucana e um heteropolissacarídeo complexo com cadeia principal β -D-(1 \rightarrow 4)-manopirranose.

III. OBJETIVOS

1 OBJETIVO PRINCIPAL

Comparar o desempenho das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* na formação de biomassa, astaxantina e parede celular.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a formação de biomassa e astaxantina pelas cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, empregando como substratos limitantes glucose, sacarose e caldo de cana nos cultivos em frascos;
- Visualizar e analisar as paredes celulares das células das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* por microscopia eletrônica de transmissão e por morfometria;
- Cultivar em biorreator por processo descontínuo alimentado as cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* para a formação de biomassa e astaxantina utilizando substrato limitante caldo de cana;
- Determinar a composição primária de monossacarídeos da parede celular das células das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* cultivadas em meio contendo caldo de cana.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1 MICRORGANISMO

Os microrganismos utilizados foram a cepa mutante *Phaffia rhodozyma* PR-18, obtida por Bonfim (1999) por mutagênese química com *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina; e a cepa selvagem de referência ATCC 24202 da levedura *Phaffia rhodozyma*, adquirida da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos da América;

Bonfim (1999) cultivou em frascos a cepa mutante PR-18 da levedura *Phaffia rhodozyma*, a qual demonstrou indícios de ser promissora na formação do pigmento astaxantina sem diminuição de biomassa, o que indica que pode ter um interesse comercial.

2 MATÉRIA-PRIMA

2.1 CALDO DE CANA “IN NATURA”

O caldo de cana utilizado como substrato nos meios de cultivo foi adquirido em janeiro de 2007, proveniente de plantações de cana-de-açúcar da região sul do estado do Paraná. Após a moagem da cana-de-açúcar, o caldo de cana foi transportado ao laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações em caixa térmica contendo gelo.

O caldo de cana foi centrifugado a 3000 rpm em centrífuga Sigma 2-3, por 15 minutos, para remover restos celulares e materiais contaminantes da própria moagem da cana-de-açúcar. A seguir o caldo de cana foi filtrado em algodão hidrofílico, fracionado em alíquotas de 200 mL e congelado à -20 °C para conservação.

A concentração de açúcares totais (DUBOIS, et al., 1956) foi determinada no caldo de cana antes de sua conservação e após degelo, no momento do preparo dos meios de cultivo.

2.2 REAGENTES

Foram utilizados reagentes analíticos das marcas Merck, Sigma Chemicals, Dow Corning, Difco, Carlo Erba, Fisher Chemicals e Tedia.

3 MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultivo utilizados na manutenção e crescimento dos microrganismos estão descritos nos itens 3.1, 3.2 e 3.3.

3.1 MEIO DE MANUTENÇÃO

Composição do meio de cultura:

α -D-Glucose	0,10 g
Extrato de levedura	0,05 g
Peptona	0,05 g
Água destilada q.s.p	100 mL

3.2. MEIO DE CULTIVO CONTENDO α -D-GLUCOSE OU SACAROSE

Composição do meio de cultivo:

Fonte de carbono	2,0 g
Extrato de levedura	0,1 g
Peptona	0,5 g
Água destilada q.s.p	100 mL

O meio de cultivo foi preparado com apenas uma fonte de carbono, sendo esta glucose ou sacarose.

No caso da utilização dos meios de cultivo na forma sólida, foi acrescentado 1,5 g de ágar. Os meios foram distribuídos na razão de 1/3 do volume total dos tubos e, após esterilização, os mesmos foram inclinados para solidificação.

3.3 MEIO DE CULTIVO CONTENDO CALDO DE CANA *IN NATURA*

Composição do meio de cultivo:

Caldo de cana <i>in natura</i>	2,0 g de açúcares totais
Uréia	0,1 g
Água destilada q.s.p	100 mL

O volume de caldo de cana a ser empregado no meio foi definido pela determinação da concentração de açúcares totais, segundo item 5.2 de “Materiais e Métodos”. A solução de uréia foi adicionada ao meio somente após esterilização.

Para todos os meios de cultivo o pH foi medido em potenciômetro WTW, modelo 300i, à temperatura ambiente, e corrigido a 5,5 com solução de hidróxido de sódio 40 g.L⁻¹ ou solução de ácido sulfúrico a 10% (v/v). A seguir os meios foram esterilizados em autoclave vertical Phoenix, empregando-se calor úmido, a 121 °C, 1 atmosfera de pressão, por 20 minutos.

3.4 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A conservação das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* é realizada por transferência periódica com repiques trimestrais, para manter a viabilidade das células.

As cepas são cultivadas em meio de manutenção e crescidas em estufa Tecnal, modelo TE-391, a 25 °C durante 72 horas. Após o crescimento, as cepas selvagem e mutante PR-18 da levedura *Phaffia rhodozyma* são mantidas em geladeira a 4 °C.

4 CULTIVO EM FRASCOS DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

4.1 PREPARO DAS SUSPENSÕES DOS MICRORGANISMOS

As cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* foram cultivadas em meio sólido contendo glucose (item 3.2 de “Materiais e Métodos”) em estufa Tecnal modelo TE-391, a 25 °C, durante 48 horas. A partir dessas culturas puras, foram preparadas as suspensões dos microrganismos tendo como diluentes os meios líquidos de cultivo (itens 3.2 e 3.3) e foram determinados os números de células viáveis.mL⁻¹ (item 5.3).

4.2 CULTIVO EM FRASCOS

Um volume adequado das suspensões das cepas mutante PR-18 e selvagem, recém-preparadas, como descrito no item 4.1, foi transferido para cada meio líquido de cultivo para obter a concentração inicial de 10⁶ células viáveis.mL⁻¹ de meio. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, e preenchidos de modo a respeitar a proporção 1:5 entre o volume de meio e volume do frasco. Os mesmos foram mantidos a 25 °C e 150 rpm, em agitador-incubador de movimento rotatório Marconi, modelo MA420, durante 96 horas.

Os cultivos das cepas mutante PR-18 e selvagem para todos os meios empregados ocorreram ao mesmo tempo, para que as condições ambientais fossem idênticas para os microrganismos de estudo. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

Os controles dos experimentos foram realizados a cada 24 horas, sendo: determinação do pH, concentração de açúcares totais e formação de biomassa e astaxantina.

4.3 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS

As células foram separadas dos meios de cultivo por centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos em centrífuga Bio Eng, modelo BE-6000. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de açúcares totais e as células

presentes no precipitado foram lavadas com água destilada, e em seguida secas em liofilizador Labconco 4.5 até peso constante. As células secas foram utilizadas para quantificação da concentração celular e de astaxantina.

5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1 DETERMINAÇÃO DE pH

Para todas as amostras coletadas durante os cultivos realizados em frascos o pH foi medido em potenciômetro WTW, modelo 300i, à temperatura ambiente.

5.2 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS

Os carboidratos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico do fenol-ácido sulfúrico, em aparelho Shimadzu, modelo UV1601PC (DUBOIS, et al., 1956).

5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS.mL⁻¹

Inicialmente foram realizadas as contagens de células totais mL⁻¹ em microscópio óptico utilizando-se a câmara de Neubauer (CARVALHO, 1994). Em seguida foi determinada a porcentagem de células viáveis empregando a solução de azul de metileno (PATTERSON, 2004).

A técnica de coloração com azul de metileno consiste em se misturar partes iguais da suspensão de levedura, adequadamente diluída, e da solução corante azul de metileno 1:5000. As células com alta atividade fisiológica não se coram, enquanto as células inativas (mortas) apresentam-se coradas de azul.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A avaliação da concentração celular ou biomassa seca nos cultivos em frascos e biorreator foi realizada pelo método gravimétrico, técnica do peso seco, a qual consistiu na centrifugação de 40 mL de cultivo em centrífuga Janetzki T23 a 4000 rpm, por 5 minutos, lavagem das células para remoção de meio e secagem das células em liofilizador Labconco 4.5 até peso constante. As células secas foram pesadas em balança analítica Marte Adventure AR2140.

A determinação da concentração de biomassa seca em g.L^{-1} foi realizada segundo a equação (1) (HISS, 2001).

$$X_t = \frac{X}{V} \quad (1)$$

Onde: X_t = concentração em biomassa seca (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo

X = biomassa seca (g)

V = volume de amostra (L)

5.5 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASTAXANTINA

A extração e cálculo de concentração de astaxantina para os cultivos em frascos foram realizados segundo Bonfim (1999). A um tubo de ensaio contendo as células secas provenientes de 40 mL de cultivo das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* foram adicionados 2 mL de dimetilsulfóxido p.a. A seguir, o tubo foi agitado vigorosamente e deixado em repouso por 30 minutos, após esse tempo foram acrescentados 6 mL de acetona p.a. O tubo foi homogeneizado e centrifugado em centrífuga Bio Eng, modelo BE-6000, a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido em um funil de separação, e no sedimento foi repetido o processo de extração anterior até esgotamento do pigmento, reunindo-se os sobrenadantes. Ao volume total de sobrenadante reunido no funil de separação adicionou-se 10 mL de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% p/v e 10 mL de éter de petróleo p.a. Agitou-se vigorosamente para separação das fases aquosa e etérea. Este processo foi repetido até que todo o pigmento passasse da fase aquosa para o éter de petróleo p.a. As fases etéreas foram reunidas, desidratadas por filtração sobre sulfato de sódio anidro, transferidas para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi

completado com éter de petróleo p.a. A absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV1601PC, a 474 nm.

A concentração celular de astaxantina ($P_{P/X}$) e concentração volumétrica de astaxantina (P_t) obtidas dos cultivos em frascos foram determinadas conforme Bonfim (1999), a partir de dados da literatura da absorvidade específica para xantofilas a 474 nm: $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1600$ (ANDREWES; PHAFF; STARR, 1976, JOHNSON; LEWIS, 1979).

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1600 \quad \therefore \quad \text{Solução } 1\text{g} - 100\text{mL} \quad - \quad \text{Absorbância} = 1600$$

$$1\text{g} - 100\text{ mL} \quad \text{----} \quad 1600$$

$$1\mu\text{g}.\text{mL}^{-1} \quad \text{----} \quad 0,16$$

$$x\mu\text{g}.\text{mL}^{-1} \quad \text{----} \quad \text{Absorbância da amostra}$$

$$x\mu\text{g} \quad \text{----} \quad 1\text{ mL}$$

$$y\mu\text{g} \quad \text{----} \quad 25\text{ mL}$$

$$y\mu\text{g} \quad \text{----} \quad z\text{ g de célula seca da amostra (técnica do peso seco)}$$

$$P_{P/X}\mu\text{g} \quad \text{----} \quad 1\text{ g de célula seca}$$

$$P_{P/X} = \mu\text{g de astaxantina por grama de célula seca}$$

$$1\text{ mg}.\text{L}^{-1} \quad \text{----} \quad 0,16$$

$$x\text{ mg}.\text{L}^{-1} \quad \text{----} \quad \text{Absorbância da amostra}$$

$$x\text{ mg} \quad \text{----} \quad 1\text{ L}$$

$$P_t\text{ mg} \quad \text{----} \quad 0,025\text{ L}$$

$$P_t = \text{mg de astaxantina por litro}$$

6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E MORFOMETRIA

Para o conhecimento de características das paredes celulares das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, foram utilizadas a microscopia eletrônica de transmissão e morfometria.

As células das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* empregadas para visualização em microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas a partir dos cultivos em frascos contendo os substratos limitantes glucose, sacarose e caldo de cana, segundo item 4.2 de “Materiais e Métodos”.

Uma alíquota de 0,5 mL de cada cultivo foi transferida para um tubo plástico com tampa de 1,5 mL de capacidade, e deixada em repouso por aproximadamente 30 minutos para a decantação das células. O sobrenadante foi descartado e as células presentes no precipitado foram fixadas com reagente de Karnowsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4,0% e cloreto de cálcio 0,075% e pH 7,5 em tampão cacodilato 0,1 M) por 15 minutos a 25 °C. Após a fixação do material o mesmo foi lavado com tampão cacodilato 0,1 M (TRELSTAD; REVEL; HAY, 1966). Em seguida as células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1 M durante uma hora, a 4 °C. A contrastação em blocos foi realizada com acetato de uranila 2% durante duas horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e, em seguida, colocado em acetona. A impregnação e inclusão ocorrem em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e diamante.

Os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYNOLDS, 1963). O material foi observado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

Foram realizadas 140 imagens da cepa mutante PR-18 da levedura *Phaffia rhodozyma* para cada substrato limitante utilizado nos cultivos, sendo glucose, sacarose e caldo de cana. O mesmo procedimento foi realizado para a selvagem, totalizando 840 imagens diferentes em aumento de 20.000 vezes.

A morfometria das imagens obtidas foi realizada utilizando-se o programa UTHSCSA *Image Tool* 3.0, desenvolvido pela *University of Texas Health Science Center* em San Antonio, Texas. O programa se encontra disponível gratuitamente pelo endereço eletrônico <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>. A morfometria foi efetuada pela medição de quatro pontos da parede celular de cada célula (pontos norte-sul-leste-oeste) e foram utilizadas 140 células para cada cepa em cada meio

de cultivo em que a mesma foi crescida, totalizando 3360 dados de medidas para as duas cepas em todos os meios de cultivo empregados.

7 CULTIVO EM BIORREATOR DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

Para o cultivo das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* foram preparados os inóculos a partir de suspensões dos microrganismos, segundo item 4.1, as quais foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL do meio de cultivo com caldo de cana (item 3.3). Na seqüência, os frascos foram mantidos a 25 °C e 150 rpm em agitador-incubador de movimento rotatório Marconi, modelo MA420, por 48 horas. A quantidade de inóculo empregada em todos os cultivos foi de 10% (v/v) do volume total de meio contido na dorna, com concentração de 10^6 células viáveis mL⁻¹.

Os processos foram realizados em Biorreator Biostat B, B.Braun, em dorna de 10 L de capacidade total contendo 6 L de meio com caldo de cana, e foram empregadas as condições de 25 °C de temperatura, 400 rpm de agitação, fluxo de aeração de 1 vvm e pH 5,5. As soluções empregadas para a correção automática do pH foram solução aquosa de hidróxido de sódio a 40 g.L⁻¹ ou solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% (v/v). Essas condições ambientais foram mantidas durante todo o período dos cultivos, o qual foi de 96 horas. A cada intervalo de 24 horas foram retiradas amostras para acompanhamento do consumo de açúcares totais, item 5.2, e formação de biomassa, item 5.4, e astaxantina. As células foram separadas do meio de cultivo de acordo com item 4.3 de “Materiais e Métodos”.

Os cultivos foram realizados por processo descontínuo alimentado, também conhecido por processo em batelada alimentada. Neste tipo de processo, um ou mais nutrientes são adicionados ao reator durante o cultivo e os produtos não são retirados até o final do processo (CARVALHO; SATO, 2001).

Em 48 horas de cultivo foi adicionado aos meios um volume de 500 mL de solução nutritiva com a concentração de açúcares totais de 11 g% p/v fornecida pelo caldo de cana suplementado com uréia 0,1% p/v, para as cepas mutante PR-18 e selvagem.

A quantificação do pigmento astaxantina produzido durante os cultivos em biorreator foi determinada pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Às células secas provenientes de 40 mL de cultivo foram adicionados 5 mL de acetona, seguido de maceração em gral com pistilo. A fração contendo o solvente orgânico foi retirada e a extração foi realizada tantas vezes quanto necessário à obtenção de todo o pigmento. As frações orgânicas foram reunidas, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 5000 rpm em centrífuga Janetzki T23 durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de celulose regenerada 0,22 μm (Millipore) e foi utilizada alíquota de 2 mL para posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência. Desta amostra foram injetados 20 μL em cromatógrafo modelo Varian, bomba ternária Prostar 210, válvula Rheodyne e programa Workstation Star 6.0, equipado com coluna Kromasyl 100 C18, 5 μm x 4,6 mm x 250 mm. Os picos foram monitorados a 474 nm em detector UV-VIS Prostar 320.

Como fase móvel utilizou-se a mistura de 90% de metanol e 10% de acetonitrila, com fluxo de 1 mL por minuto, sendo 6 minutos de corrida (BORGES, 2006). Nessas condições o padrão do carotenóide eluiu a 5,1 minutos.

A curva padrão para o pigmento astaxantina (Sigma Aldrich) foi determinada com concentrações de 20 a 100 mg.L^{-1} , a qual serviu como base para os cálculos de concentração volumétrica de astaxantina (P_t) nas amostras analisadas. As concentrações celulares de astaxantina ($P_{P/X}$) foram calculadas segundo equação (2).

$$P_{P/X} = \left(\frac{P_t}{X_f} \right) \times 1000 \quad (2)$$

Onde: $P_{P/X}$ = concentração celular de astaxantina (μg de astaxantina por grama de célula seca) no tempo t de cultivo

P_t = concentração volumétrica de astaxantina (mg.L^{-1}) no tempo t de cultivo

X_t = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo

Durante a determinação da concentração de astaxantina nos métodos espectrofotométrico e cromatográfico, a manipulação do padrão e das amostras foi realizada em recipientes protegidos da luz para evitar perdas dos componentes fotossensíveis.

Durante os cultivos das cepas mutante PR-18 e selvagem em frascos e biorreator foram realizados controles para verificar a presença de contaminantes, como análises de coloração de Gram e exames a fresco em lâmina ao microscópio óptico (BIER, 1980). No início de cada cultivo os meios não inoculados foram mantidos em agitador-incubador a 25 °C e 150 rpm como controles negativos, para confirmação da eficiência da esterilização.

Todos os cultivos em frascos e em biorreator das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* ocorreram na ausência de luz. Estudos conduzidos por Johnson e Lewis inicialmente sugeriam que a luz não influenciava a formação e composição dos carotenóides pela levedura *Phaffia rhodozyma* (JOHNSON, LEWIS, 1979), entretanto, posteriormente, foi comprovado o efeito da iluminação ocasionando diminuição na pigmentação da levedura, particularmente em alta intensidade de luz e na presença de fotossensibilizadores (AN, JOHNSON, 1990; JOHNSON, 2003).

8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

A comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo é possível por intermédio de variáveis como as velocidades de transformação e os fatores de conversão. Uma definição especial de velocidade é a produtividade em biomassa ou a concentração do produto, denominada produtividade do produto, cujo interesse prático está na avaliação do desempenho de um processo. Os fatores de conversão relacionam em um determinado tempo de cultivo os correspondentes valores de biomassa, substrato e produto entre si (HISS, 2001). Os parâmetros cinéticos de produtividade em biomassa e astaxantina e os fatores de conversão de substrato em biomassa e em astaxantina foram calculados para os cultivos em frascos e em biorreator.

8.1 PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA

A produtividade em biomassa representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo de cultivo, e pode ser calculada pela equação **(3)** (HISS, 2001).

$$P_X = \frac{(X_t - X_0)}{t_f} \quad (3)$$

Onde: P_X = produtividade em biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

X_t = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo

X_0 = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no início do cultivo

t_f = tempo de cultivo (h)

8.2 PRODUTIVIDADE EM ASTAXANTINA

A produtividade em astaxantina representa a velocidade média de formação do produto em relação ao tempo de cultivo, e pode ser calculada pela equação **(4)** (HISS, 2001).

$$(P_t - P_0) \quad (4)$$

$$P_p = \frac{\quad}{t_f}$$

Onde: P_p = produtividade em astaxantina ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

P_t = concentração volumétrica de astaxantina (mg.L^{-1}) no tempo t de cultivo

P_0 = concentração volumétrica de astaxantina (mg.L^{-1}) no início do cultivo

t_f = tempo de cultivo (h)

8.3 FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA

O fator de conversão de substrato em biomassa possibilita a avaliação do cultivo a partir da biomassa formada em relação à quantidade de açúcares totais consumida pelo microrganismo, segundo equação **(5)** (HISS, 2001)

$$Y_{x/s} = \frac{(X_t - X_0)}{(S_0 - S)} \quad (5)$$

Onde: $Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em biomassa (g de biomassa seca obtida por grama de açúcar total consumido)

X_t = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo

X_0 = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no início do cultivo

S_0 = concentração do substrato (g.L^{-1}) no início do cultivo

S = concentração do substrato (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo

8.4 FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM ASTAXANTINA

O fator de conversão de substrato em astaxantina possibilita a avaliação do cultivo a partir da quantidade de astaxantina formada em relação à quantidade de açúcares totais utilizado pelo microrganismo, segundo equação **(6)** (HISS, 2001)

$$Y_{p/s} = \frac{(P_t - P_0)}{(S_0 - S)} \quad (6)$$

Onde: $Y_{P/S}$ = fator de conversão de substrato em astaxantina (mg de astaxantina obtida por grama de açúcar total consumido)

P_t = concentração de astaxantina (mg.L^{-1}) no tempo t de cultivo

P_0 = concentração de astaxantina (mg.L^{-1}) no início do cultivo

S_0 = concentração do substrato (g.L^{-1}) no início do cultivo

S = concentração do substrato (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo

A concentração do produto no início do cultivo (P_0) é geralmente desprezível.

9 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS PAREDES CELULARES

A partir de vinte gramas de células secas das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, obtidas dos cultivos em biorreator (conforme item 4.3 de “Materiais e Métodos”) foram tratadas com 400 mL de solução de dodecilsulfato de sódio a 2% p/v sob agitação, durante 24 horas, a temperatura ambiente. A seguir, os resíduos celulares foram separados do sobrenadante por centrifugação em centrífuga Sigma 2-3, a 3500 rpm por 15 minutos. Este procedimento foi repetido quatro vezes obtendo-se quatro sobrenadantes para cada cepa: I, II, III e IV. O objetivo do uso dessa solução detergente foi obter resíduos celulares isentos de ácidos nucléicos e proteínas citoplasmáticas. O acompanhamento dessa remoção foi realizado pelo método de Biureto aplicado aos sobrenadantes de cada etapa. Também foi pesquisada uma possível perda em carboidratos, empregando-se o método de Dubois (1956). O resíduo celular isento de ácidos nucléicos e proteínas das cepas mutante PR-18 e selvagem foi utilizado para extração de carboidratos de parede celular, realizada com três diferentes solventes: água fria, água quente e dimetilsulfóxido.

Primeiramente, aos precipitados provindos da extração com dodecilsulfato de sódio a 2% p/v foram adicionados 400 mL de água fria. As frações foram mantidas sob agitação constante por 24 horas em temperatura ambiente. Os precipitados foram separados dos sobrenadantes por centrifugação a 4000 rpm, em centrífuga Sigma 2-3, durante 20 minutos. O procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se três frações de sobrenadante para cada cepa: Água fria I, II e III.

A seguir foram adicionados 400 mL de água quente (80 °C), e os precipitados foram mantidos sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Os resíduos celulares foram separados por centrifugação a 4000 rpm, em centrífuga Sigma 2-3,

durante 20 minutos. O procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se as frações Água quente I, II e III de sobrenadante para cada cepa.

O último solvente utilizado para extração foi o dimetilsulfóxido, em que os precipitados foram mantidos sob agitação constante por duas horas, a temperatura ambiente. Os resíduos celulares apresentaram grande solubilização no solvente, desta forma, a separação foi realizada por centrifugação em equipamento Janetzki T23 6000 rpm, por 20 minutos. O procedimento foi repetido três vezes, obtendo-se as frações de sobrenadante Dimetilsulfóxido I, II e III para cada cepa.

Os resíduos celulares restantes foram congelados e reservados para futuras extrações com solventes alcalinos.

As nove frações de sobrenadante obtidas para cada cepa foram tratadas com três volumes de etanol absoluto e os precipitados formados foram separados por centrifugação em centrífuga Sigma 2-3 a 4000 rpm por 5 minutos. A seguir os precipitados foram solubilizados em água e dialisados durante 24 horas. Após a diálise as frações foram secas por liofilização em liofilizador Labconco 4.5 para cálculo de rendimento e posterior hidrólise ácida total dos polissacarídeos presentes nas frações.

9.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram determinadas em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV1601PC, pelo método do Biureto (KRESZE, 1983).

9.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DOS POLISSACARÍDEOS DE PAREDE CELULAR

As frações provenientes das etapas de extração oriundas das cepas mutante PR-18 e selvagem foram submetidas à hidrólise ácida total com ácido trifluoracético (HOUGH; JONES; WUSTEMAN, 1972) 114 g.L⁻¹, durante 8 horas a 100 °C, para a obtenção dos monossacarídeos que compõem os polissacarídeos presentes nas amostras (WORANOVICZ, 1995). Na sequência, as frações foram evaporadas até secura e novamente solubilizadas em pequena quantidade de água. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para redução e acetilação e posterior análise em cromatografia líquido-gasosa.

9.3 REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ETAPA DE HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

As frações oriundas da etapa de hidrólise ácida total e solubilizadas em água foram reduzidas com boridreto de sódio durante um tempo mínimo de 12 horas, em temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963). Em seguida as soluções foram tratadas com resina catiônica fortemente ácida para retirada do sódio, filtradas e levadas à secar em evaporação sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi removido com sucessivas lavagens com metanol e posterior evaporação, na forma de boridreto de trimetila.

A reação para a formação de acetatos de alditóis, com intuito de tornar a molécula volátil para análise em cromatografia líquido-gasosa, foi realizada adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 1 mL de piridina (catalisador) durante 24 horas, em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de gelo e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio em funil de separação. A piridina residual foi extraída da fração clorofórmica por sucessivas lavagens com solução aquosa de sulfato de cobre a 5% p/v. A fração clorofórmica foi evaporada em temperatura ambiente até secar, e as amostras foram analisadas por cromatografia líquido-gasosa.

9.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PRIMÁRIA DE MONOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA

Os acetatos de alditóis obtidos após as etapas de redução e acetilação foram analisados por Cromatografia Líquido-Gasosa em cromatógrafo Hewlett Packard 5890, com detector de ionização de chama (300 °C) e injetor (250 °C), sendo utilizado nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,0 mL por minuto) e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25 µm). Foi utilizado também o cromatógrafo do fabricante Thermo Eletron Corporation, modelo Trace GC Ultra, com detector de ionização de chama (250 °C) e injetor (280 °C), empregando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.), revestida com OV-225 (0,25 µm).

As análises dos acetatos de alditóis foram realizadas inicialmente na temperatura de 100 °C com um aumento de 60 °C por minuto até 220 °C.

10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O desvio padrão foi calculado para os resultados obtidos em relação à concentração de açúcares totais, formação de biomassa e astaxantina.

O programa Sigmastat 3.2 foi utilizado para as análises estatísticas. Foram realizadas análises com Teste Tukey para comparações entre as médias das espessuras de parede celular das células das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 CALDO DE CANA *IN NATURA*

Apesar do popular consumo do caldo de cana, o mesmo até o momento não foi relacionado nos bancos de dados das Tabelas de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP, 2004) e do United States Department of Agriculture (USDA, 2008).

A composição do caldo de cana *in natura* descrito pela literatura é de 3% a 5% de minerais, como ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio, além de vitaminas do complexo B e vitamina C. Tem-se, ainda, 65% a 75% de água e a sacarose corresponde a 70% a 91% de sólidos solúveis totais. Também faz parte da composição a glucose (2% a 4%), frutose (2% a 4%), proteínas (0,5% a 0,6%), amido (0,001% a 0,05%), ceras e ácidos graxos (0,05% a 0,015%) e pigmentos (3% a 5%) (OLIVEIRA, et al., 2006).

A avaliação da composição do caldo de cana fornece subsídios para a utilização do mesmo nos processos biotecnológicos como um meio rico em sacarose e outros nutrientes, tornando-o um excelente substrato, além de seu baixo custo. Bonfim (1999) demonstrou que a utilização do caldo de cana fresco, simplesmente diluído, com ou sem suplementação, e independente da origem ou época do ano de colheita da cana-de-açúcar, pode ser empregado como um meio de cultivo adequado para o crescimento e produção de pigmentos carotenóides, em especial a astaxantina, pela levedura *Phaffia rhodozyma*.

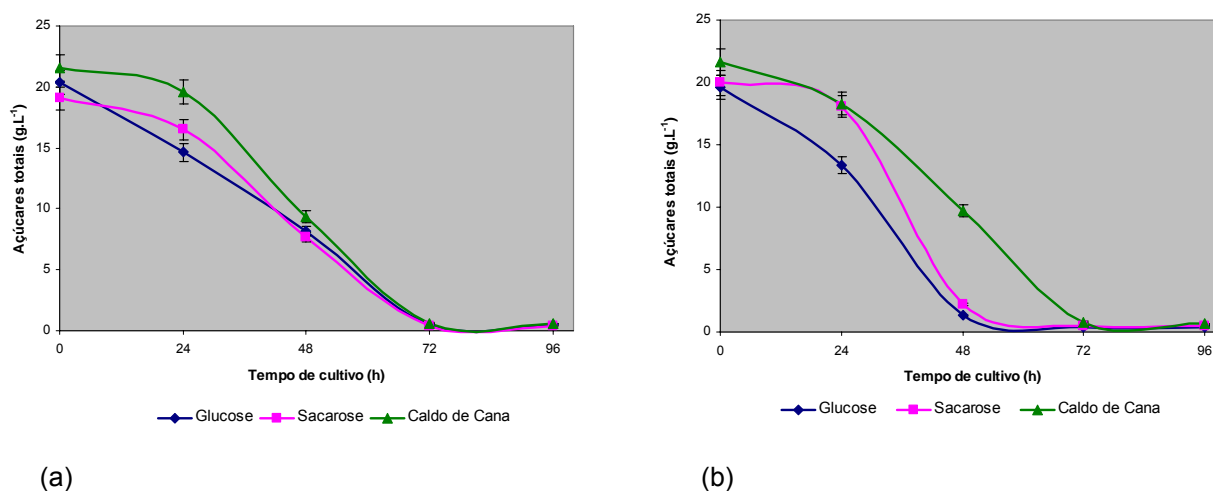
Em razão da composição do caldo de cana, de sua facilidade de obtenção e dos resultados observados por Bonfim (1999) e Moriel (2004) o mesmo foi empregado nos experimentos para o cultivo das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*. A determinação do volume a ser utilizado na composição do meio de cultivo foi realizada após a quantificação da concentração de açúcares totais (DUBOIS, et al., 1956) do caldo de cana, resultando em 276 g.L⁻¹, conforme item 5.2 de “Materiais e Métodos”.

2 CULTIVO EM FRASCOS DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

Com o objetivo de avaliar o desempenho dos cultivos das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* na formação de biomassa e astaxantina em função do tempo de cultivo, foram realizados experimentos em frascos, segundo item 4.2 de “Materiais e Métodos”, utilizando-se diferentes meios, contendo como substratos limitantes a glucose, sacarose e o caldo de cana e determinados os parâmetros de pH, concentração de açúcares totais e formação de biomassa e astaxantina. Também foram realizadas análises para verificar a pureza dos cultivos, as quais mostraram que os mesmos foram feitos sem a presença de contaminantes.

Os resultados obtidos em relação ao consumo dos substratos limitantes pela levedura *Phaffia rhodozyma*, cepas mutante PR-18 e selvagem, estão demonstrados na Figura 2.

FIGURA 2 – CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (g.L^{-1}) PELAS CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”) E SELVAGEM (“b”) DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO (h), NOS MEIOS CONTENDO OS SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA



NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

A concentração do substrato limitante foi cerca de 20 g.L^{-1} no tempo zero em todos os meios de cultivo utilizados para as cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*.

Em relação ao consumo de açúcares totais pela cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* (Figura 2b) observa-se que a glucose é consumida rapidamente ao longo do processo em relação aos demais substratos limitantes. Considerando-se o tempo de 48 horas de cultivo, verifica-se no meio contendo glucose e sacarose

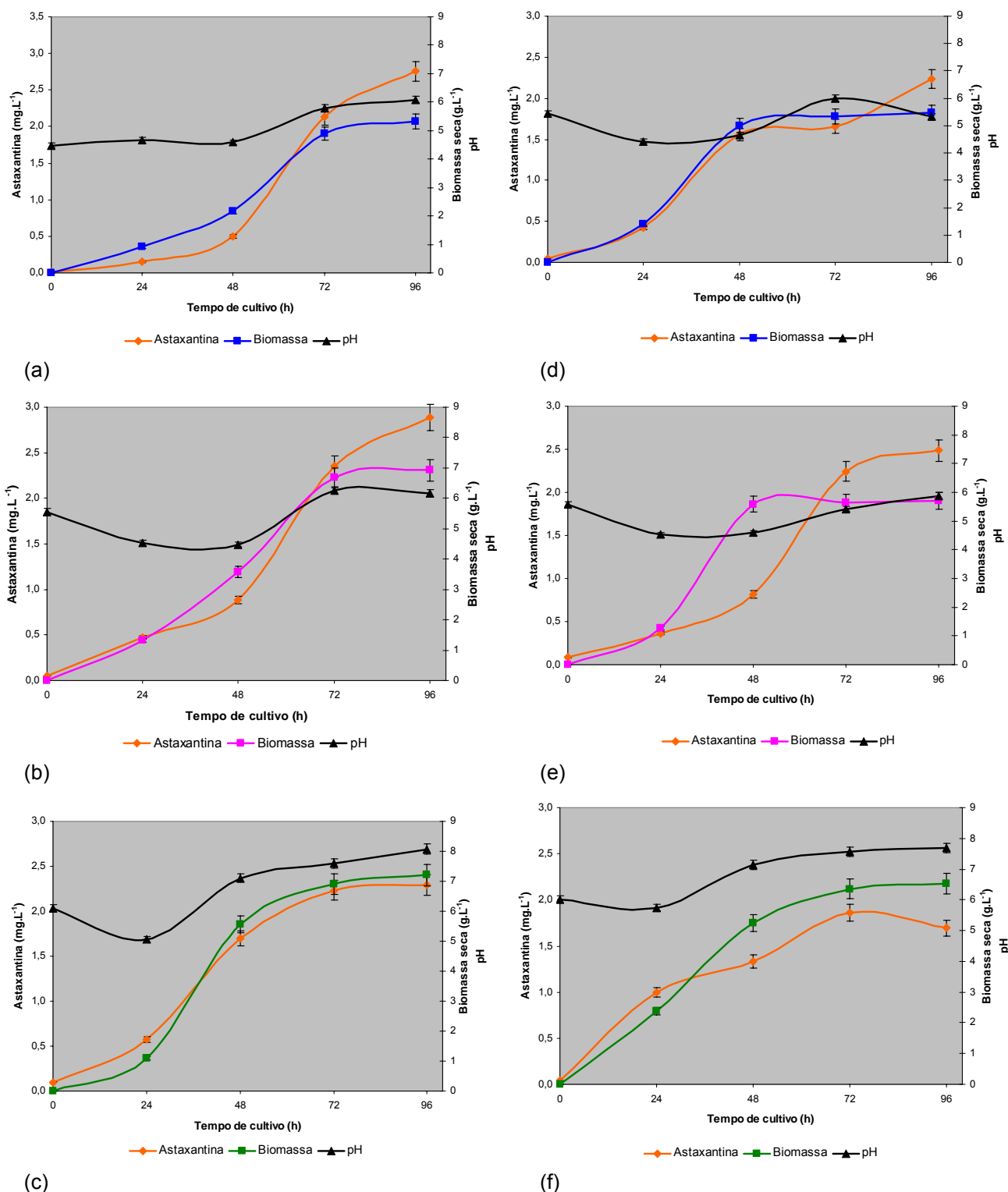
uma concentração de substrato residual 7,5 e 4,4 vezes menor, respectivamente, do que no meio com caldo de cana. Para a cepa mutante PR-18 (Figura 2a), no mesmo tempo de cultivo, houve pequena variação nas concentrações de açúcares residuais, as quais foram de 8,19 g.L⁻¹, 7,67 g.L⁻¹ e 9,33 g.L⁻¹ para os meios com glucose, sacarose e caldo de cana, respectivamente.

Na Figura 2 percebe-se que entre 72 e 96 horas de cultivo das cepas mutante PR-18 e selvagem praticamente não houve variação nas concentrações de açúcares nos meios. As concentrações de açúcares residuais para ambas as cepas foram em média de 0,47 g.L⁻¹ para os substratos glucose e sacarose e 0,65 g.L⁻¹ para o caldo de cana em 96 horas de cultivo.

An, Jang e Cho (2001) utilizaram o melaço, o qual é composto pela sacarose, glucose e frutose, para o cultivo da cepa mutante *Phaffia rhodozyma* 2A2N, isolada por indução com antimicina e mutagênese serial em *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina. Os autores verificaram que os três açúcares acumularam na fase lag e a sacarose foi completamente metabolizada nas primeiras horas do crescimento exponencial. A glucose, seguida da frutose, foram assimiladas lentamente somente após a depleção da sacarose no meio. Persike e colaboradores (2002) citam que a invertase e urease são enzimas presentes em qualquer estágio do ciclo de crescimento celular da levedura *Phaffia rhodozyma*, o que está diretamente relacionado à assimilação de fontes de carbono.

Para uma descrição quantitativa dos cultivos das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* foram determinados a concentração celular (X_t), concentração volumétrica de astaxantina (P_t), os valores de pH e os resultados estão representados na Figura 3.

FIGURA 3 – VARIAÇÃO DO pH E FORMAÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA PELAS CEPAS MUTANTE PR-18 (“a”, “b” E “c”) E SELVAGEM (“d”, “e” E “f”) DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, NOS MEIOS CONTENDO GLUCOSE (“a” E “d”), SACAROSE (“b” E “e”) E CALDO DE CANA (“c” E “f”), EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO (h)



(c) (f)
NOTA: As barras de erro representam o desvio padrão

Na Figura 3 (“d” e “e”) observa-se o crescimento celular da cepa selvagem, em que o início da fase estacionária ocorreu em 48 horas e as concentrações celulares (X_t) foram de 5,01 g.L⁻¹ e 5,64 g.L⁻¹ nos meios contendo glucose e

sacarose, respectivamente. Para o caldo de cana (Figura 3 “f”) o início da fase estacionária aconteceu em 72 horas, com concentração celular de $6,35 \text{ g.L}^{-1}$. A concentração celular máxima (X_{max}) foi de $6,53 \text{ g.L}^{-1}$ para o meio com caldo de cana, seguido da sacarose, com $5,84 \text{ g.L}^{-1}$, e glucose, em torno de $5,47 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas de cultivo.

Em relação ao crescimento celular da cepa mutante PR-18, verifica-se pela Figura 3 (“a”, “b” e “c”) o início da fase estacionária em 72 horas, com valores de concentração celular de $4,89 \text{ g.L}^{-1}$, $6,68 \text{ g.L}^{-1}$ e $6,92 \text{ g.L}^{-1}$, e concentrações celulares máximas (X_{max}) de $5,33 \text{ g.L}^{-1}$, $6,92 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,21 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas de cultivo, quando foram empregados os meios contendo glucose, sacarose e caldo de cana respectivamente.

Esses resultados de pequenas alterações nas concentrações celulares a partir do início da fase estacionária até 96 horas de cultivo podem ser atribuídos à concentração residual de substrato e aos produtos do metabolismo presentes no meio.

Com base nos resultados da Figura 3, considerando-se as composições dos meios e o tempo de cultivo, os maiores valores de concentração celular máxima para as cepas mutante PR-18 e selvagem foram obtidos no meio contendo o substrato limitante caldo de cana.

Fang e Cheng (1993) obtiveram a cepa mutante NCHU-FS301 por ação da *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina e observaram seu desempenho no cultivo em frascos, utilizando diferentes fontes de carbono com concentração inicial de 10 g.L^{-1} .

Observaram que a frutose apresentou a melhor taxa de crescimento celular, de $4,93 \text{ g.L}^{-1}$, seguido da glucose e sacarose, de $4,78 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,59 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente, entre todas as demais fontes testadas, as quais foram: maltose, lactose, melaço, L-arabinose, D-rafinose, D-celobiose, D-manitol, D-sorbitol e xilose. Em relação à concentração celular de astaxantina, o melhor desempenho foi obtido no cultivo em glucose, $7809,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (FANG; CHENG, 1993).

Os dados apresentados pela Figura 3 (“a” e “b”) mostram que a cepa mutante PR-18 apresentou maior concentração celular para glucose e sacarose em relação à cepa mutante NCHU-FS301.

Experimentos com a cepa mutante *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501, também obtida por *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina, cultivada em frascos com fontes de carbono, com concentração inicial de 10 g.L^{-1} , sendo: frutose, glucose, melaço, rafinose e sacarose. A maior concentração celular, de $7,2 \text{ g.L}^{-1}$, foi obtida com a

utilização do melaço em relação às demais fontes de carbono testadas (FANG; CHIOU, 1996), resultado semelhante foi observado no crescimento da cepa mutante PR-18 quando cultivada em caldo de cana (Figura 3 “c”). Já a formação em biomassa da cepa mutante NCHU-FS501 foi de 6,43 g.L⁻¹ e 5,72 g.L⁻¹ para os cultivos em glucose e sacarose respectivamente, valor maior do que o observado para a cepa mutante PR-18 em glucose e menor para o cultivo em sacarose.

Yamane e colaboradores (1997a) analisaram o efeito da fonte de carbono na produção de astaxantina pela cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202 empregando cultivo em frascos com diferentes composições de meio.

Observaram que a taxa de crescimento celular foi maior para os cultivos contendo 20 g.L⁻¹ de concentração inicial de frutose (7,7 g.L⁻¹), maltose (6,1 g.L⁻¹) e sacarose (6,7 g.L⁻¹), em relação ao cultivo controle em glucose (5,7 g.L⁻¹), porém sem alterações na produção da astaxantina, a qual, para o cultivo controle foi de 300 µg de astaxantina por grama de célula seca (YAMANE, et al., 1997a).

A determinação da formação da astaxantina é necessária quando se trata da levedura *Phaffia rhodozyma*, em virtude da mesma ser de interesse comercial quando contém o pigmento.

Os resultados de concentração volumétrica de astaxantina obtidos dos cultivos das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* estão apresentados na Figura 3.

A concentração volumétrica de astaxantina (P_t) foi calculada de acordo com item 5.5 de “Materiais e Métodos”, e os valores de concentração volumétrica máxima (P_{max}) para a cepa mutante PR-18 foram de 2,75 mg.L⁻¹ para a glucose, 2,89 mg.L⁻¹ em sacarose e 2,29 mg.L⁻¹ para o caldo de cana.

Para a cepa selvagem, os valores de concentração volumétrica máxima (P_{max}) nos cultivos em glucose, sacarose e caldo de cana foram de 2,24 mg.L⁻¹, 2,50 mg.L⁻¹ e 1,86 mg.L⁻¹, respectivamente.

As concentrações volumétricas máximas de astaxantina, para ambas as cepas, foram alcançadas em 96 horas de cultivo e nos ensaios realizados os maiores valores foram conseguidos nos cultivos em sacarose, tanto para a cepa mutante PR-18 quanto para a cepa selvagem.

O conteúdo de astaxantina também foi avaliado pela determinação da concentração celular de astaxantina, segundo item 5.5 de “Materiais e Métodos”.

Em relação à concentração celular de astaxantina ($P_{P/X}$) quando foram cultivadas as cepas mutante PR-18 e selvagem em meio com glucose, as maiores

concentrações celulares foram de 516,48 μg de astaxantina por grama de célula seca para a cepa mutante PR-18 e de 409,1 μg de astaxantina por grama de célula seca para a cepa selvagem, valores esses superiores a 300 μg de astaxantina por grama de célula seca obtido por Yamane e colaboradores (1997a) quando utilizaram glucose. Para o cultivo em meio contendo sacarose, as cepas selvagem e mutante PR-18 apresentaram concentrações celulares máximas de astaxantina de 436,54 μg e 417,72 μg de astaxantina por grama de célula seca, respectivamente.

Os menores valores de concentração celular máxima de astaxantina foram de 317,92 μg e 293,3 μg de astaxantina por grama de célula seca para as cepas mutante PR-18 e selvagem, respectivamente, quando cultivadas em meio com caldo de cana.

As maiores concentrações volumétricas e celulares de astaxantina foram conseguidas em 96 horas de cultivo para as cepas mutante PR-18 e selvagem, nos três substratos limitantes empregados, à exceção da cepa selvagem quando cultivada no caldo de cana, em que os valores máximos ocorreram em 72 horas.

Em 2006 Hu e colaboradores relataram que a produção do carotenóide é extremamente influenciada pelo pH. Os pesquisadores analisaram a cepa *Xanthophyllomyces dendrorhous* 46, realizando experimentos com pH inicial entre 3,5 e 6,5 e observaram que o melhor valor para o crescimento celular foi de pH inicial 6,0 e para a produção de astaxantina pH 5,5.

A variação do pH durante o crescimento celular ou produção de astaxantina pelas cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* pode ser observada na Figura 3.

Em todos os cultivos os valores de pH inicial ficaram entre 5,0 e 6,0, e esse parâmetro não foi corrigido, o qual variou ao longo dos processos. A maioria dos dados de literatura sobre condições de cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* indicam o pH 5,0 como ideal para o crescimento celular ou produção de astaxantina, tanto para cepa selvagem quanto para cepas mutantes (AN, et al., 1996).

Nos ensaios contendo os substratos limitantes glucose e sacarose, suplementados com extrato de levedura e peptona, conforme Figura 3 (“a”, “b”, “d” e “e”), o pH se manteve em torno de 4,5 durante o crescimento exponencial, tanto para a cepa mutante PR-18 quanto para a cepa selvagem, alcançando valores próximos a 6,0 no final dos cultivos. Contudo, quando as mesmas cepas foram cultivadas em meio contendo caldo de cana suplementado com uréia, a variação do pH foi de 5,0 a

7,0 durante o crescimento exponencial, atingindo valores em torno de 8,0 no tempo final dos cultivos (Figura 3 “c” e “f”).

Meyer e Du Preez (1993) relatam que quando são comparados os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de microrganismos, a principal alteração é a mudança de pH durante o processo.

A menor variação do pH durante as 96 horas foi verificada nos cultivos suplementados com extrato de levedura e peptona, entretanto no cultivo com caldo de cana o pH aumentou provavelmente pela hidrólise da uréia em amônia.

A análise dos resultados de concentração celular máxima (X_{max}) e dos valores de pH mostrados na Figura 3 sugere que a variação do pH de 4,5 a 8,0 não influenciou no desempenho em relação ao crescimento celular das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, em todos os meios de cultivo empregados. Os valores de pH entre 4,5 a 6,0 parecem favorecer a formação de carotenóides, pois os menores valores de concentração volumétrica máxima (P_{max}) de astaxantina foram obtidos quando o pH atingiu valores entre 6,0 e 8,0, no meio caldo de cana.

Johnson e Lewis (1979) observaram o pH ótimo em 4,5 para a cepa *Phaffia rhodozyma* UCD67-210, de propriedade do departamento de estudo, no que se refere ao crescimento e produção de astaxantina.

Meyer e du Preeze (1994) reportaram uma diminuição do pH ao longo do cultivo da cepa mutante *Phaffia rhodozyma* J4-3, obtida por *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina, e observaram que a faixa de pH entre 4,5 a 5,5 não alterava a produção de carotenóides, porém decrescia significativamente a taxa de crescimento celular com a diminuição dos valores de pH.

Fang e Chiou (1996) indicaram que entre pH 5,0 e 6,0 não ocorreu diferença significativa na concentração celular de astaxantina e carotenóides totais, por outro lado, o pH afetou a taxa crescimento específico, com melhores resultados em pH 6,0.

2.1 PRODUTIVIDADES E FATORES DE CONVERSÃO

Para uma melhor visualização e compreensão do desempenho dos cultivos em frascos das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* os

resultados obtidos foram expressos na forma de produtividades e fatores de conversão, segundo item 6 de “Materiais e Métodos”.

As produtividades em biomassa e astaxantina calculadas para o tempo final de cultivo, 96 horas, correspondem aos rendimentos, ou seja, a biomassa e astaxantina obtidas no final dos cultivos. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – VALORES MÉDIOS DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) E ASTAXANTINA ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) PARA AS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma* NOS MEIOS CONTENDO GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, NO FINAL DO CULTIVO

<i>Phaffia rhodozyma</i>	Substrato limitante	$P_X (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$	$P_P (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$
Cepa Mutante PR-18	Glucose	$0,053 \pm 0,001$	$0,459 \pm 0,001$
	Sacarose	$0,069 \pm 0,002$	$0,482 \pm 0,003$
	Caldo de Cana	$0,072 \pm 0,003$	$0,382 \pm 0,003$
Cepa Selvagem	Glucose	$0,054 \pm 0,001$	$0,364 \pm 0,002$
	Sacarose	$0,058 \pm 0,001$	$0,415 \pm 0,001$
	Caldo de Cana	$0,065 \pm 0,003$	$0,283 \pm 0,003$

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, a maior produtividade em biomassa (P_X) em cada hora foi de $0,072 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ obtida no cultivo da cepa mutante PR-18 no meio com caldo de cana, e de $0,065 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no cultivo da cepa selvagem no mesmo meio.

Em relação à produtividade em astaxantina (P_P), a cepa mutante PR-18 comparada à cepa selvagem alcançou os melhores resultados em todos os substratos limitantes empregados.

Desta forma, os valores de produtividade em biomassa (P_X) e astaxantina (P_P) estão de acordo com os resultados apresentados na Figura 2 para concentração celular máxima (X_{max}) e concentração volumétrica máxima em astaxantina (P_{max}), e sugerem que a cepa mutante PR-18 apresentou o melhor desempenho nos cultivos em frascos em relação à cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*.

Para uma comparação quantitativa do desempenho de cultivos das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* na formação de biomassa e astaxantina em relação à quantidade de açúcares totais consumida, empregando diferentes substratos limitantes, foram calculados os fatores de

conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e de substrato em astaxantina ($Y_{P/S}$), e os resultados estão mostrados na Tabela 2.

TABELA 2 – VALORES MÉDIOS DE FATORES DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA (g.g^{-1}) E EM ASTAXANTINA (mg.g^{-1}) PARA AS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma* NOS MEIOS CONTENDO GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, EM 96 HORAS DE CULTIVO

<i>Phaffia rhodozyma</i>	Substrato limitante	$Y_{X/S} (\text{g.g}^{-1})$	$Y_{P/S} (\text{mg.g}^{-1})$
Cepa Mutante PR-18	Glucose	$0,279 \pm 0,01$	$0,139 \pm 0,01$
	Sacarose	$0,357 \pm 0,01$	$0,155 \pm 0,02$
	Caldo de Cana	$0,333 \pm 0,02$	$0,109 \pm 0,03$
Cepa Selvagem	Glucose	$0,274 \pm 0,01$	$0,117 \pm 0,01$
	Sacarose	$0,289 \pm 0,02$	$0,128 \pm 0,01$
	Caldo de Cana	$0,299 \pm 0,02$	$0,081 \pm 0,04$

Com base nos dados da Tabela 2, a cepa mutante PR-18 apresenta o melhor desempenho nas três diferentes composições de meio comparada à cepa selvagem já que possui os maiores valores dos fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e substrato em astaxantina ($Y_{P/S}$).

Em fermentações industriais, dificilmente são observados valores constantes desses fatores de conversão. Embora dependam da espécie do microrganismo com relação a determinado substrato, não dependem somente da natureza desse, os demais componentes do meio também exercem influência sobre tais conversões, bem como o tempo e a transferência de oxigênio. Um determinado consumo de substrato não produzirá sempre um aumento proporcional na biomassa, sendo que uma parcela de energia proveniente daquele consumo é destinada à manutenção das funções vitais do microrganismo (HISS, 2001).

3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E MORFOMETRIA

Para o conhecimento de características das paredes celulares visando o aumento da biodisponibilidade do pigmento astaxantina uma vez que o mesmo é intracelular, as células da levedura *Phaffia rhodozyma*, cepas mutante PR-18 e selvagem, obtidas dos cultivos em frascos com os meios contendo os substratos limitantes glucose, sacarose e caldo de cana, foram visualizadas por microscopia

eletrônica de transmissão e analisadas por morfometria, conforme item 7.1 de “Materiais e Métodos”.

As imagens das células da levedura *Phaffia rhodozyma* foram registradas em aumento de 20.000 vezes, para as quais 1 μm representa 79 pixels (unidade utilizada nas medições). As Figuras 4 (“a” e “b”), 5 (“a” e “b”) e 6 (“a” e “b”) apresentam as imagens dos cortes ultra-finos das células selvagem e mutante PR-18, quando cultivadas em glucose, sacarose e caldo de cana, respectivamente.

FIGURA 4 - IMAGENS DE CORTES ULTRA-FINOS DE CÉLULAS PROVINDAS DO CULTIVO EM GLUCOSE DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, CEPAS MUTANTE PR-18 ("a") E SELVAGEM ("b"), OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM AUMENTO DE 20.000 VEZES

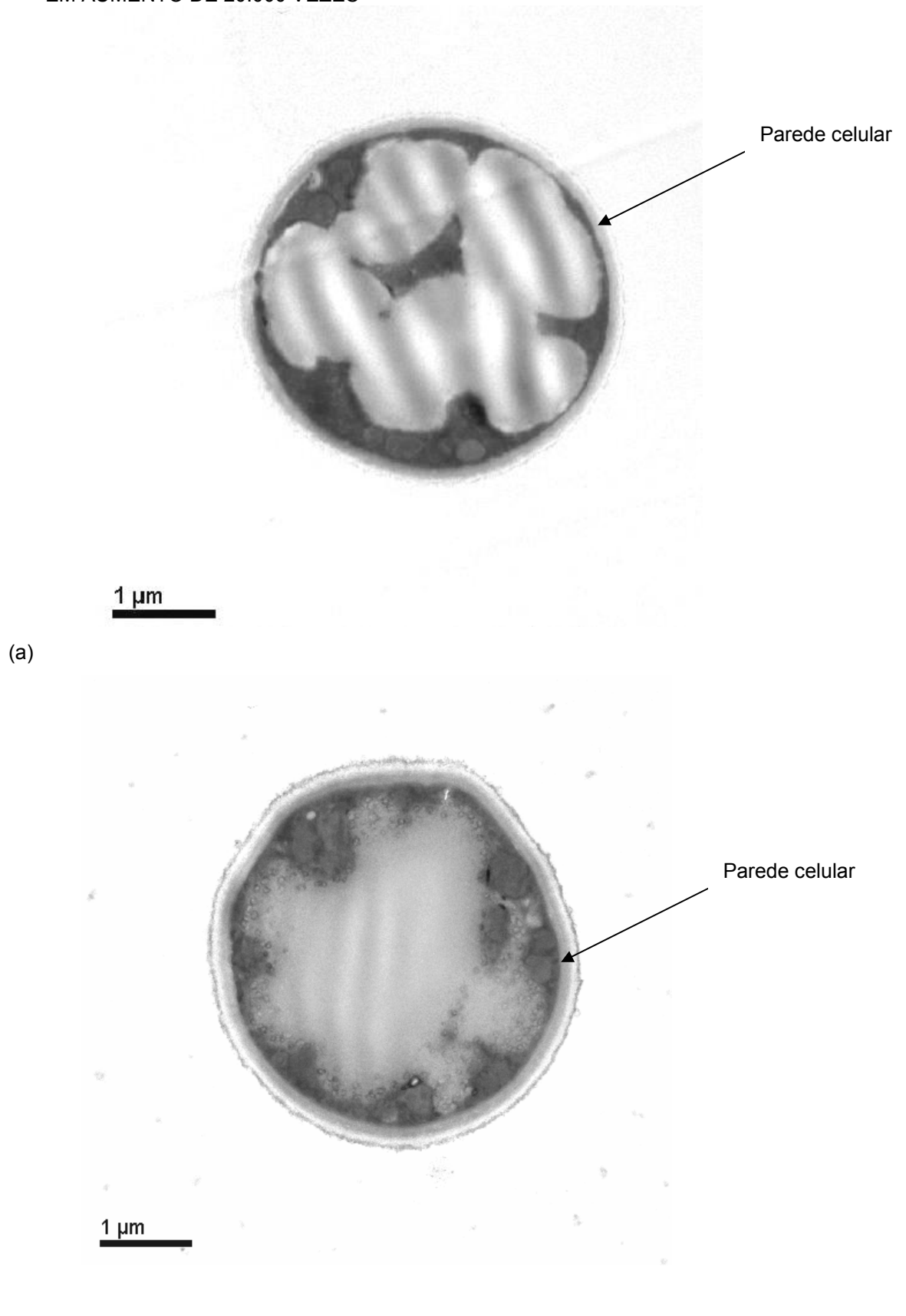
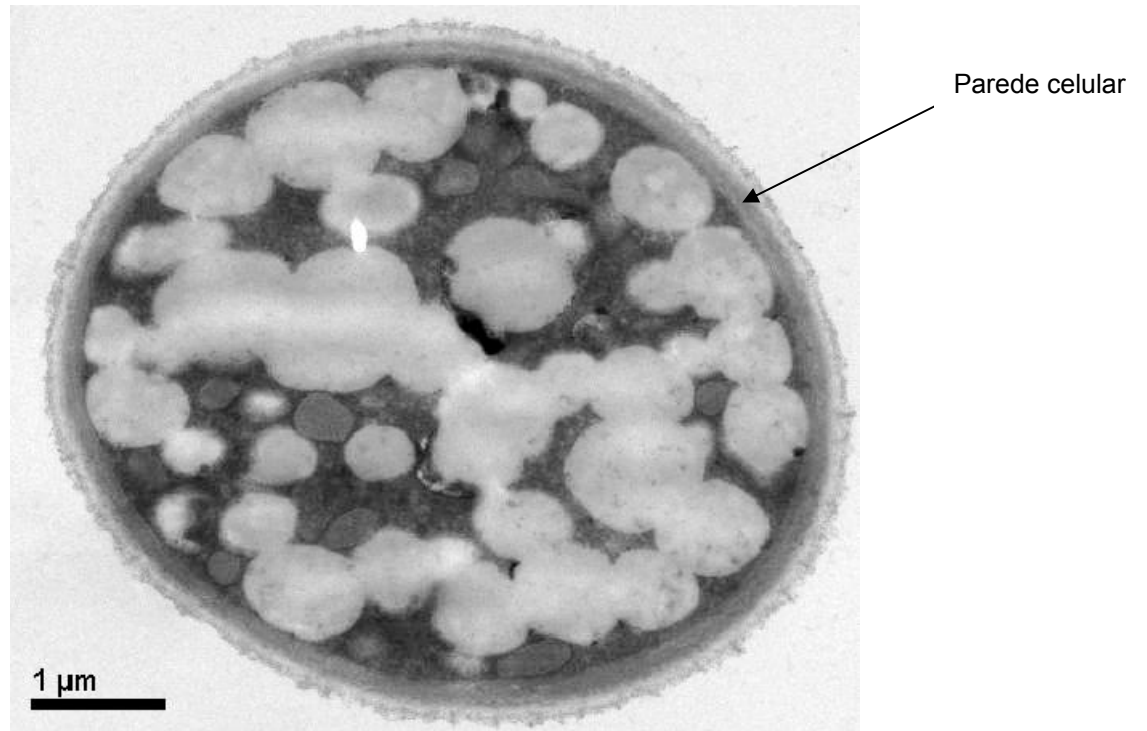
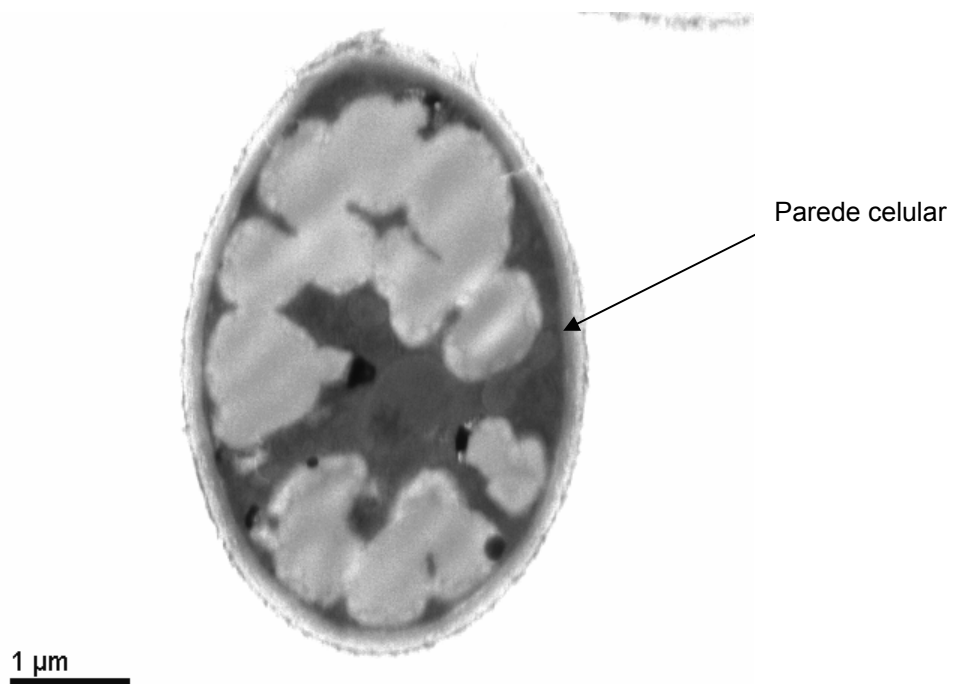


FIGURA 5 - IMAGENS DE CORTES ULTRA-FINOS DE CÉLULAS PROVINDAS DO CULTIVO EM SACAROSE DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, CEPAS MUTANTE PR-18 ("a") E

SELVAGEM ("b"), OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO
EM AUMENTO DE 20.000 VEZES

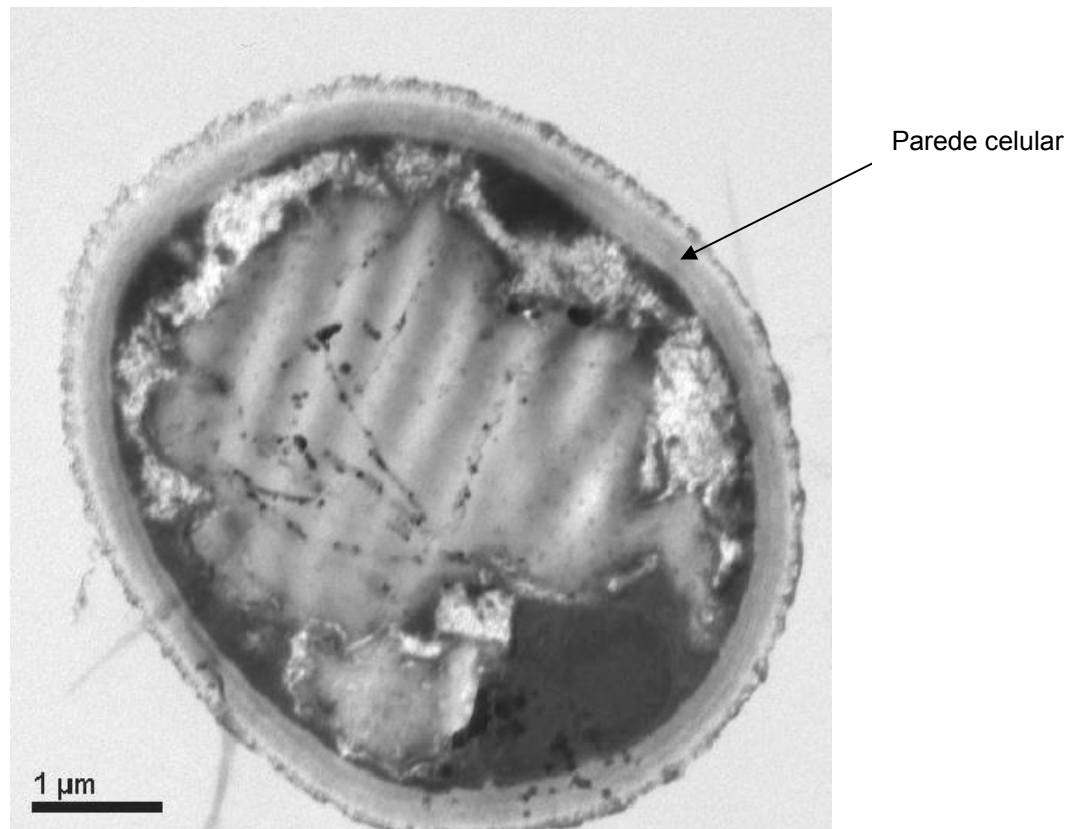


(a)

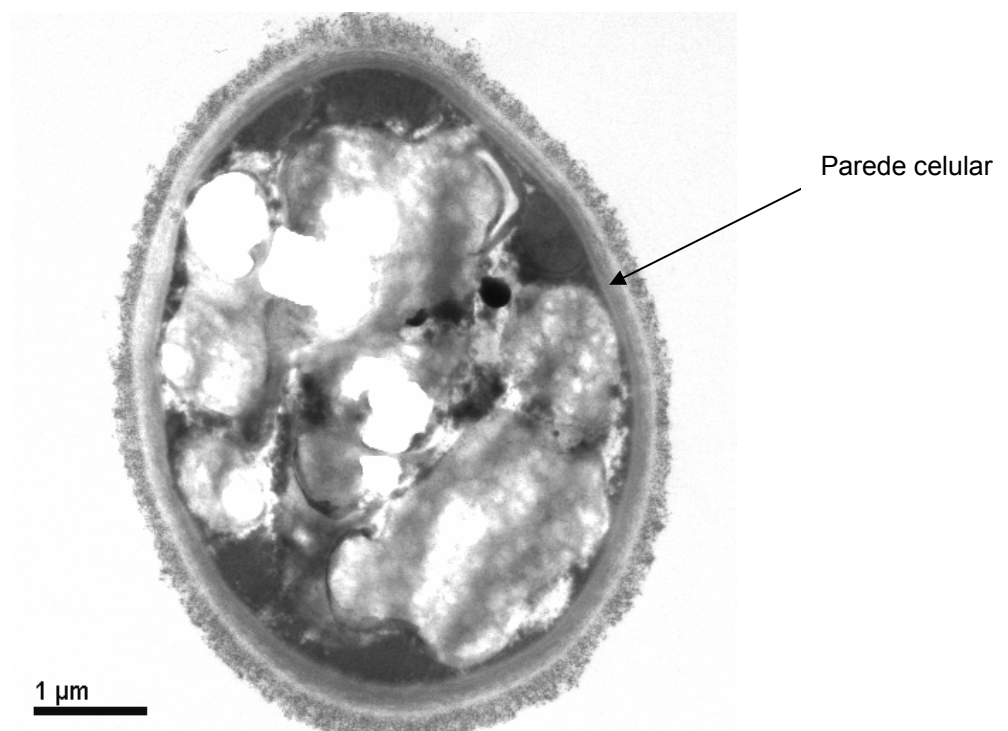


(b)

FIGURA 6 - IMAGENS DE CORTES ULTRA-FINOS DE CÉLULAS PROVINDAS DO CULTIVO EM CALDO DE CANA DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, CEPAS MUTANTE PR-18 ("a") E SELVAGEM ("b"), OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM AUMENTO DE 20.000 VEZES



(a)



(b)

As Figuras 4, 5 e 6 demonstram diferenças morfológicas entre as células obtidas nos três diferentes substratos limitantes, o que sugere a influência da composição do meio de cultivo na estrutura da parede celular da levedura *Phaffia*

rhodozyma, porém não parece existir diferenças nas imagens de parede celular entre as cepas quando cultivadas no mesmo meio.

A formação da imagem em microscopia eletrônica de transmissão tem diversas origens, uma delas se baseia no coeficiente de absorção de elétrons (REIMER, 1997), o que justifica a não visualização de organelas na levedura apesar do aumento utilizado, pois a astaxantina presente no citoplasma possui grande capacidade antioxidante, o que a torna um elemento “elétron denso” e gera a coloração escura.

Estudos citam a influência do meio de cultivo na composição da parede celular de microrganismos. Wick, Wattiau e Harms (2002) relataram a influência dos substratos utilizados no crescimento de *Mycobacterium* spp LB501T, LB307T e VM552 em relação ao perfil de ácidos micólicos que compõem a parede celular quando empregaram como fonte de carbono a glucose, alcanos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e meio Luria-Bertani. Esses pesquisadores observaram que quando a bactéria foi cultivada em meio pobre em substratos solúveis em água a mesma apresentou mais ácidos micólicos hidrofóbicos do que quando as células foram crescidas em glucose. Os resultados deste estudo indicaram que a micobactéria responde às condições de crescimento pela alteração da composição de ácidos micólicos da parede celular.

A influência da fonte de carbono nas propriedades da parede celular também fora analisada para o microrganismo *Rhodococcus erythropolis* (cepa E1) no conteúdo de ácidos micólicos. Os autores relataram a alteração na permeabilidade da parede celular desse microrganismo causada pelo regime nutricional (SOKOLOVSKA, et al., 2003).

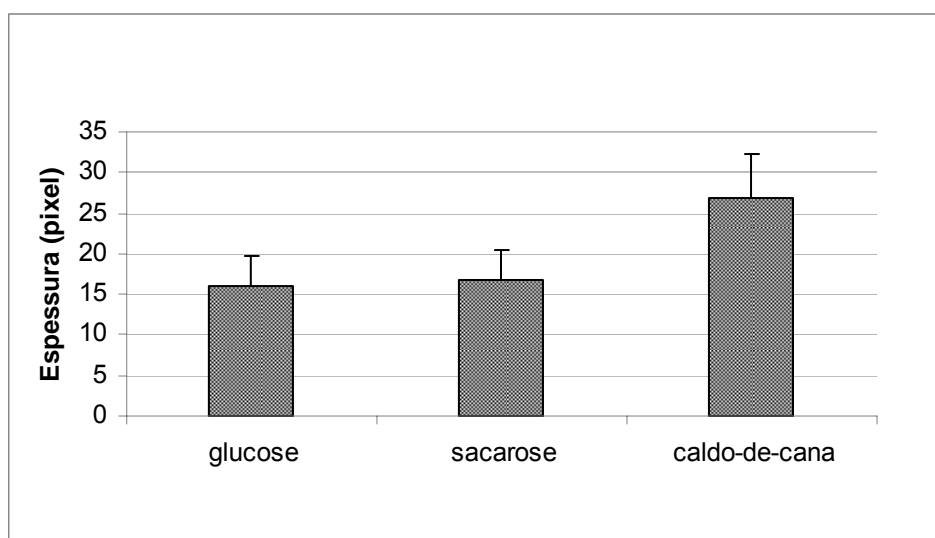
Em 2005 foi descrita a variação na hidrofobicidade e na composição protéica da parede celular do *Lactobacillus acidophilus* pela alteração da composição do meio de cultivo (SCHAR-ZAMMARETTI, et al., 2005).

As leveduras *Candida maltosa* EH 15 e EH 60, *Yarrowia lipolytica* EH 52, EH 56, EH 59 e EH 465 e *Pichia guilliermondii* H 71 foram cultivadas em meios contendo uma mistura de *n*-alcanos (dodecano e hexadecano), fenol e mistura de ambas as fontes de carbono para avaliação da alteração de hidrofobicidade de superfície celular. Para todas as cepas testadas as propriedades de hidrofobicidade variaram de acordo com as condições dos meios de cultivo. Pode-se generalizar que houve correlação entre as melhores degradações de hidrocarboneto e fenol e as propriedades de parede celular obtidas (CHRZANOWSKI, et al., 2008).

Visualmente percebe-se que a parede celular das células da levedura *Phaffia rhodozyma*, cepas mutante PR-18 e selvagem, obtidas dos cultivos em glucose e sacarose, têm menor espessura e maior densidade do que a parede celular observada nas células cultivadas em caldo de cana.

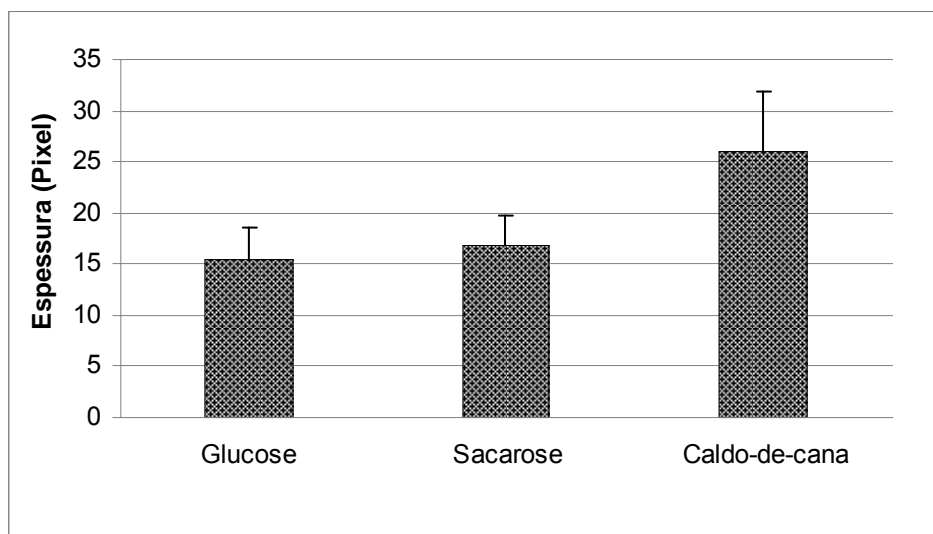
Com objetivo de confirmar as diferenças visualizadas nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, foram medidas as espessuras das paredes celulares pelo programa *Image Tool* 3.0 e as médias dos valores obtidos, bem como desvio padrão, estão apresentados nas Figuras 7 e 8.

FIGURA 7 - MÉDIAS DOS VALORES DA ESPESSURA DA PAREDE CELULAR DAS CÉLULAS DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, CEPA MUTANTE PR-18, CULTIVADAS NOS MEIOS COM SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, OBTIDAS POR MORFOMETRIA



NOTA: A barra de erro representa o Desvio Padrão

FIGURA 8 - MÉDIAS DOS VALORES DA ESPESSURA DA PAREDE CELULAR DAS CÉLULAS DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, CEPA SELVAGEM, CULTIVADAS NOS MEIOS COM SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA, OBTIDAS POR MORFOMETRIA



NOTA: A barra de erro representa o Desvio Padrão

De acordo com os dados apresentados nas Figuras 7 e 8 observa-se que as maiores médias de valores de espessura de parede celular foram obtidas para as células cultivadas em caldo de cana, tanto para a cepa mutante PR-18 quanto para a cepa selvagem.

As análises estatísticas para avaliação das possíveis diferenças significativas existentes entre os valores obtidos das medições das espessuras das paredes celulares das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* cultivadas nos diferentes substratos limitantes foram realizadas por Teste Tukey, conforme Tabela 3.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS VALORES DE ESPESSURA DE PAREDE CELULAR DAS CÉLULAS DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM, QUANDO CULTIVADAS NOS SUBSTRATOS LIMITANTES GLUCOSE, SACAROSE E CALDO DE CANA.

<i>Phaffia rhodozyma</i>	Comparação entre os substratos limitantes	Diferença entre as médias dos valores de espessura de parede celular	P
Cepa Mutante PR-18	Caldo de cana x Glucose	10,756	<0,001
	Caldo de cana x Sacarose	9,985	<0,001
	Glucose x Sacarose	0,771	<0,001
Cepa Selvagem	Caldo de cana x Glucose	10,664	<0,001
	Caldo de cana x Sacarose	9,321	<0,001
	Glucose x Sacarose	1,342	<0,001

De acordo com os dados obtidos pelo teste Tukey, demonstrados na Tabela 3, em todas as comparações das diferenças entre as médias dos valores das medidas de espessura das paredes celulares das células da levedura *Phaffia rhodozyma*, cepas mutante PR-18 e selvagem, cultivadas nos três substratos limitantes, foram determinados os valores de $P < 0,001$, o que demonstra que há diferença significativa em todas as comparações avaliadas entre dois cultivos diferentes, ou seja, aos pares.

Quando se compara as médias dos valores de espessura das paredes celulares das células da levedura *Phaffia rhodozyma* cultivadas nos meios contendo glucose e sacarose, tanto para a cepa mutante PR-18 quanto para a cepa selvagem, observa-se que a diferença é significativa, porém pequena. Já, quando se compara as médias dos valores das espessuras das paredes celulares de células obtidas do cultivo em caldo de cana com as dos cultivos em glucose ou sacarose percebe-se que as diferenças são aproximadamente dez vezes maiores, o que demonstra uma parede celular maior em extensão.

Diversos autores empregaram as células da levedura *Phaffia rhodozyma* cultivadas em glucose na alimentação animal e constataram que a única forma do astaxantina ser absorvida pelos animais é com a quebra das células para permitir a liberação do pigmento (JOHNSON; CONKLIN; LEWIS, 1977; AN; CHOI, 2003).

Além dos processos mecânicos de quebra celular, culturas mistas também foram usadas na tentativa de aumentar a capacidade de extração dos pigmentos carotenóides do interior das células da levedura. O microrganismo *Bacillus circulans* demonstrou capacidade de auxiliar a degradação da parede celular, especialmente

em condições controladas de cultivo (OKAGBUE; LEWIS, 1985; FANG; WANG, 2002).

As células intactas da cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, mesma empregada neste trabalho, foram cultivadas em meio contendo caldo de cana suplementado com uréia 0,1 g% p/v, como descrito por Bonfim (1999) e Moriel (2004), e posteriormente foram fornecidas à Universidade Federal de Santa Catarina para serem adicionadas na ração para alimentação de camarões cultivados em cativeiro, e as mesmas foram capazes de gerar a pigmentação dos animais (PASSOS, 2007).

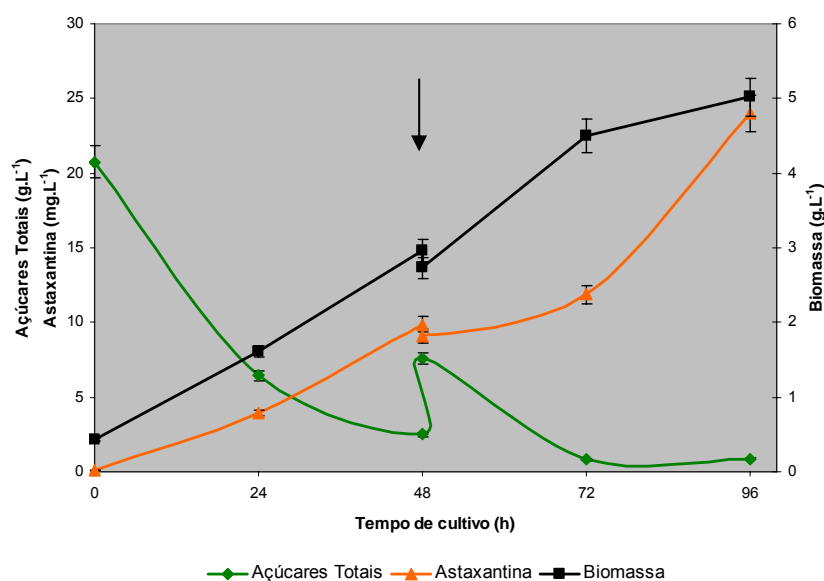
Conforme demonstrado, pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão e pela morfometria, a parede celular da cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* quando cultivada em meio contendo caldo de cana apresentou diferenças de elétron densidade e espessura, as quais podem ter sido responsáveis pela liberação do pigmento astaxantina das células intactas, observada no cultivo de camarões em cativeiro, portanto, a maior extensão da parede celular não dificultou a liberação do pigmento de interesse.

Em função das células da levedura *Phaffia rhodozyma*, cepa selvagem, cultivadas em meio com caldo de cana se mostrarem promissoras na utilização como suplemento na ração animal, as cepas mutante PR-18 e selvagem foram cultivadas em biorreator.

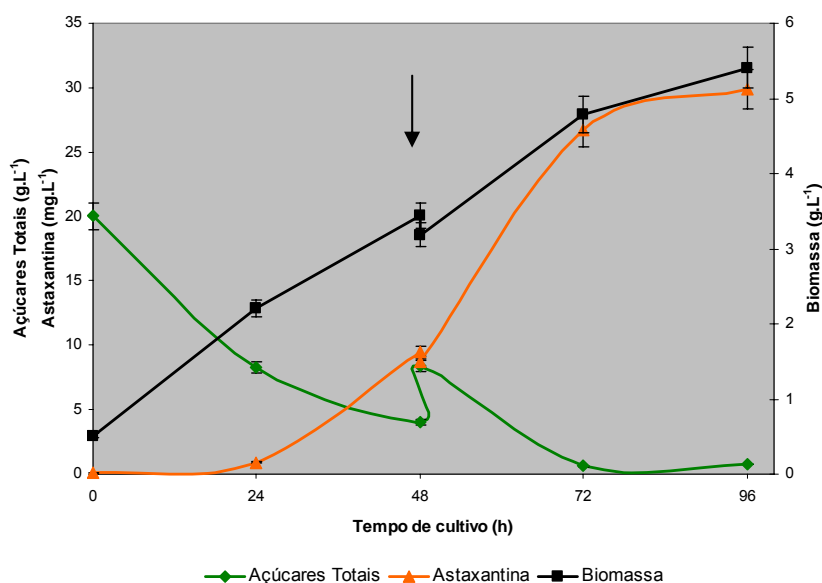
4 CULTIVO EM BIORREATOR DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*

Com intuito de comparar quantitativamente as cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* na formação de biomassa e astaxantina, as mesmas foram cultivadas em biorreator com substrato limitante caldo de cana, no qual apresentaram maiores diferenças em parede celular, empregando o processo descontínuo alimentado, conforme item 4.3 de “Materiais e Métodos”. A cada 24 horas foram coletadas amostras, realizadas as análises de coloração de Gram e exames a fresco em lâmina, as quais mostraram que todos os processos ocorreram sem a presença de contaminantes, e foram determinadas a concentração de açúcares totais e a formação de biomassa e astaxantina. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 9.

FIGURA 9 - VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS (g.L^{-1}) E FORMAÇÃO DE BIOMASSA (g.L^{-1}) E ASTAXANTINA (mg.L^{-1}) PELAS CEPAS MUTANTE PR-18 ("a") E SELVAGEM ("b") DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO, NO PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO



(a)



(b)

NOTA 1: As setas indicam os tempos de alimentação

NOTA 2: As barras de erro indicam o desvio padrão

As concentrações iniciais de açúcares totais nos cultivos das cepas mutante PR-18 e selvagem foram em torno de 20 g.L^{-1} . Como pode ser observado na Figura 9, em 48 horas de cultivo a cepa mutante PR-18 consumiu uma quantidade maior de açúcares totais, em torno de $17,5 \text{ g.L}^{-1}$, em relação à cepa selvagem, que foi cerca de 16 g.L^{-1} . Nos processos descontínuos alimentados as alimentações com solução

nutritiva realizadas em 48 horas de cultivo foram capazes de restaurar a concentração de açúcares totais nos meios para aproximadamente 8 g.L^{-1} .

Considerando-se o tempo entre 72 e 96 horas de cultivo das cepas mutante PR-18 e selvagem as concentrações de açúcares residuais nos meios foram em torno de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Hu e colaboradores (2005) realizaram em biorreator um processo descontínuo com concentração inicial de glucose de 80 g.L^{-1} e 144 horas de cultivo, tendo sido obtidas as concentrações máximas de biomassa e astaxantina em 108 e 132 horas, respectivamente. A partir de 120 horas de cultivo a concentração residual de glucose permaneceu inalterada em cerca de 5 g.L^{-1} .

Os resultados de concentração celular (X_t) e concentração volumétrica de astaxantina (P_t) representados na Figura 9 mostram que a adição de solução nutritiva promoveu uma diluição no meio de cultivo, ocasionando uma conseqüente diminuição nas concentrações de biomassa e astaxantina em 48 horas de processo.

Em relação ao crescimento celular da cepa selvagem (Figura 9 “b”) e da cepa mutante PR-18 (Figura 9 “a”), verifica-se em 48 horas, antes da alimentação, que as concentrações celulares (X_t) foram de $3,44 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,96 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Nos processos, a concentração celular máxima (X_{\max}) obtida em 96 horas de cultivo foi de $5,41 \text{ g.L}^{-1}$ para a cepa selvagem e $5,01 \text{ g.L}^{-1}$ para a cepa mutante PR-18.

Quanto à formação de astaxantina pelas cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* nos processos realizados, os valores de concentração volumétrica máxima em astaxantina (P_{\max}) foram conseguidos em 96 horas de cultivo tanto para a cepa selvagem quanto para a cepa mutante PR-18, os quais foram de $27,75 \text{ mg.L}^{-1}$ e $22,29 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Em relação à concentração celular de astaxantina ($P_{P/X}$), os valores foram de $512,98 \text{ } \mu\text{g}$ de astaxantina por grama de célula seca para a cepa selvagem e de $444,03 \text{ } \mu\text{g}$ de astaxantina por grama de célula seca para a cepa mutante PR-18, conforme representado na Figura 9.

O desempenho dos processos descontínuos alimentados também foi avaliado quantitativamente segundo item 6 de “Materiais e Métodos”, e os resultados obtidos relacionados às produtividades em biomassa (P_X) e astaxantina (P_P) e aos fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e substrato em astaxantina ($Y_{P/S}$), estão demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) E ASTAXANTINA ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) E FATORES DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM BIOMASSA (g.g^{-1}) E EM ASTAXANTINA (mg.g^{-1}) PARA AS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA

LEVEDURA *Phaffia rhodozyma* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO, NOS
PROCESSOS DESCONTÍNUOS ALIMENTADOS

<i>Phaffia rhodozyma</i>	Tempo de cultivo (h)	P_X (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_P (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (mg.g ⁻¹)
Cepa Mutante PR-18	24	0,072 ± 0,002	0,165 ± 0,01	0,112 ± 0,02	0,276 ± 0,02
	48	0,062 ± 0,002	0,206 ± 0,01	0,162 ± 0,02	0,541 ± 0,02
	72	0,050 ± 0,002	0,153 ± 0,01	0,180 ± 0,02	0,552 ± 0,03
	96	0,049 ± 0,003	0,115 ± 0,02	0,234 ± 0,02	1,121 ± 0,03
Cepa Selvagem	24	0,092 ± 0,001	0,047 ± 0,01	0,188 ± 0,01	0,075 ± 0,01
	48	0,072 ± 0,002	0,207 ± 0,01	0,215 ± 0,02	0,592 ± 0,01
	72	0,062 ± 0,001	0,344 ± 0,02	0,231 ± 0,01	1,278 ± 0,03
	96	0,052 ± 0,001	0,289 ± 0,01	0,261 ± 0,01	1,440 ± 0,02

Pode-se observar na Tabela 4 que as produtividades variam de acordo com a eficiência do processo, bem como com o tipo da cepa.

Com relação aos dados de produtividade em biomassa (P_X) verifica-se que a maior velocidade média de crescimento celular ocorreu no tempo de 24 horas de cultivo, tanto para a cepa selvagem, com 0,092 ± 0,001 g.L⁻¹.h⁻¹, quanto para a cepa mutante PR-18, com 0,072 ± 0,002 g.L⁻¹.h⁻¹. O rendimento em biomassa, ou seja, valores de produtividade no tempo final de cultivo, foram semelhantes para ambas as cepas.

Os valores de produtividade em biomassa calculados para os processos descontínuos alimentados e para os cultivos em frascos empregando meio com caldo de cana, em 96 horas de cultivo, demonstram que não há diferenças entre o rendimento em biomassa para as cepas mutante PR-18 e selvagem.

Comparando-se os dados de produtividade em astaxantina (P_P) da Tabela 4 para as cepas selvagem e mutante PR-18, a melhor produtividade foi conseguida para a cepa selvagem, sendo de 0,344 ± 0,02 mg.L⁻¹.h⁻¹ em 72 horas de cultivo. Já para a cepa mutante, a maior produtividade em astaxantina, 0,206 ± 0,01 mg.L⁻¹.h⁻¹, ocorreu em 48 horas.

Considerando-se a produtividade em astaxantina no tempo final de cultivo, obteve-se um rendimento aproximadamente três vezes maior quando foi empregada a cepa selvagem em relação à cepa mutante.

De acordo com os dados da Tabela 4, os maiores valores dos fatores de conversão foram obtidos no processo descontínuo alimentado utilizando a cepa selvagem, os quais foram de 0,261 ± 0,01 g de biomassa e 1,440 ± 0,02 mg de

astaxantina por grama de substrato consumido. Esses fatores de conversão indicam a maior eficiência na conversão de substrato em biomassa e astaxantina pela cepa selvagem.

Considerando-se os resultados mostrados na Figura 9 e na Tabela 4 dos cultivos em biorreator empregando como substrato limitante o caldo de cana, verifica-se que a cepa selvagem apresentou o melhor desempenho tanto no que se refere ao crescimento celular quanto à formação do pigmento carotenóide astaxantina em relação à cepa mutante PR-18.

Nos cultivos realizados em frascos laboratoriais, os quais correspondem à primeira indicação que um processo de interesse comercial é possível, a cepa mutante PR-18 demonstrou o melhor desempenho em relação à formação de biomassa e astaxantina quando comparada à cepa selvagem utilizando o meio com caldo de cana. No entanto, no fermentador de pequena escala (10 L), no qual foram realizadas as primeiras tentativas de escalonamento, é necessário testar alterações no meio, temperatura e pH para um melhor desempenho da cepa mutante PR-18 na formação de biomassa e astaxantina.

5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PRIMÁRIA DE MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS PAREDES CELULARES

Com objetivo de caracterizar a composição primária de monossacarídeos da parede celular das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* cultivadas em meio contendo caldo de cana, foram utilizadas as células secas obtidas dos cultivos em biorreator, conforme item 4.3 de “Material e Métodos”, das quais foram extraídos os polissacarídeos de parede celular, segundo item 7.2, utilizando água fria e quente e dimetilsulfóxido, os quais deram origem a três frações (I, II e III) para cada solvente extrator.

Após as extrações o material obtido foi submetido à hidrólise ácida, redução e acetilação e analisado por cromatografia líquido-gasosa, itens 7.4, 7.5 e 7.6 de “Materiais e Métodos”, para determinação da composição primária de monossacarídeos das nove frações, as quais estão demonstradas na Tabela 5.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO PRIMÁRIA DE MONOSSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES DAS PAREDES CELULARES DAS CEPAS MUTANTE PR-18 E SELVAGEM DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma* CULTIVADAS EM MEIO COM CALDO DE CANA

Fração		Monossacarídeos constituintes da fração (mol%)									
		Cepa Mutante PR-18					Cepa Selvagem				
		ram	xil	man	gal	glu	ram	xil	man	gal	glu
Água Fria	I	-	43,52	8,80	11,61	36,07	3,84	50,08	5,44	16,84	21,16
	II	84,51	5,00	1,07	4,72	2,71	3,02	36,59	6,97	22,16	26,69
	III	0,56	2,81	0,94	3,38	2,95	1,43	21,11	7,64	17,15	45,41
Água Quente	I	70,04	9,81	2,31	3,41	11,69	10,99	34,38	6,68	15,88	28,51
	II	84,75	4,49	1,65	3,37	3,50	2,26	33,46	7,12	15,95	41,21
	III	18,88	29,92	4,72	8,38	36,26	9,70	34,68	8,59	13,61	28,96
Dimetil sulfóxido	I	0,88	47,79	5,71	7,18	37,91	0,23	41,91	7,19	14,02	35,74
	II	-	32,35	5,99	6,22	43,30	1,02	26,35	5,25	16,01	48,01
	III	0,24	39,65	6,21	6,89	42,21	1,03	24,83	5,79	17,43	47,51

NOTA: ram =ramnose; xil = xilose; man = manose; gal = galactose; glu = glucose

Considerando-se os monossacarídeos presentes em todas as frações obtidas das etapas de extração das paredes celulares das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, verifica-se os maiores percentuais de ramnose nas frações água fria e quente (84,51 mol% e 84,75 mol%, respectivamente), e de 47,79 mol% de xilose e 43,30 mol% de glucose nas frações de extração com dimetilsulfóxido em relação aos demais monossacarídeos para a cepa mutante PR-18; já para a cepa selvagem, os monossacarídeos presentes em maior porcentagem foram a xilose, com 50,08 mol%, e a glucose, com 48,01 mol%, em todas as frações analisadas.

De acordo com os dados da Tabela 5, a cepa selvagem apresenta maior porcentagem de galactose (22,16 mol%) em relação à cepa mutante PR-18 (11,61 mol%) na composição primária de monossacarídeos. As porcentagens obtidas em todas as frações de extração para a manose indicam semelhança de concentração desse monossacarídeo entre as cepas selvagem e mutante PR-18, sendo os maiores valores de 8,59 mol% e 8,80 mol%, respectivamente.

Na terceira extração de parede celular em água fria para a cepa mutante PR-18 verifica-se apenas 12,71% da composição molar total em virtude de dificuldades na análise.

Os monossacarídeos fucose, ribose e arabinose também foram encontrados em algumas frações analisadas, porém em quantidades insignificantes.

Borges (2006) determinou a composição primária de monossacarídeos da parede celular da cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*, mesma cepa

usada neste trabalho, porém cultivada em biorreator com meio contendo sacarose. Os resultados mostraram maior porcentagem de glucose (85,72 mol%) na fração de extração com dimetilsulfóxido e manose (50,88 mol%) nas frações de extração com água fria e quente, seguido de xilose (21,01 mol%), água quente, e galactose (15,22 mol%), água fria.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os descritos por Borges (2006) para a mesma cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* cultivada nas mesmas condições ambientais, diferindo apenas no emprego do substrato limitante, ou seja, caldo de cana e sacarose, as maiores diferenças em relação à composição primária de monossacarídeos são observadas nos percentuais de xilose, manose e ramnose.

VI. CONCLUSÕES

Nos cultivos em frascos, a cepa mutante PR-18 apresentou o melhor desempenho na formação de biomassa e astaxantina nos meios com glucose, sacarose e caldo de cana comparada à cepa selvagem, de acordo com os valores de concentração celular máxima (X_{\max}), concentração volumétrica máxima de astaxantina (P_{\max}), produtividade em biomassa (P_X), produtividade em astaxantina (P_P) e fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e substrato em astaxantina ($Y_{P/S}$).

As paredes celulares das células das cepas mutante PR-18 e selvagem não apresentaram diferenças entre si nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão e analisadas por morfometria. A comparação das médias dos valores das espessuras das paredes celulares de células das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* provenientes dos cultivos em caldo de cana com as dos cultivos em glucose ou sacarose mostraram que as diferenças são aproximadamente dez vezes maiores do que a comparação entre médias dos valores das espessuras das paredes celulares de células dos cultivos de glucose e sacarose, o que sugere uma parede celular maior em extensão nos cultivos em caldo de cana.

Nos cultivos em biorreator com caldo de cana, considerando-se os valores de concentração celular máxima (X_{\max}), concentração volumétrica máxima de astaxantina (P_{\max}), produtividade em biomassa (P_X), produtividade em astaxantina (P_P) e fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e substrato em astaxantina ($Y_{P/S}$), a cepa selvagem apresentou o melhor desempenho tanto no que se refere ao crescimento celular quanto à formação de astaxantina em relação à cepa mutante PR-18.

Os resultados obtidos das frações de extração das paredes celulares das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* mostram a maior diferença nos percentuais da composição primária de monossacarídeos para a ramnose em extração com água quente, sendo 84,75 mol% para a cepa mutante PR-18 e 10,99 mol% para a cepa selvagem.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADM. **Astaxanthin**, 2008. Disponível em: <http://www.admworld.com/naen/ahn/astaxanthin.asp>. Acesso em: 01 Set. 2008.

AGROLINK. **Cotações de commodities agrícolas**, 2008. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/cotacoes/Cotacoes.aspx>. Acesso em: 03 Set. 2008.

AKIBA, Y.; SATO, K.; TAKAHASHI, K. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. **Japanese Poultry Science**, v.10, n.2, p.154-161, 2001.

AKIBA, Y.; et al. Pigmentation of egg yolk with yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentration of astaxanthin in laying hens fed on a low-carotenoid diet. **Japanese Poultry Science**, v.37, n.2, p.77-85, 2000.

AN, G. H.; CHOI, E. S. Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin. **Biotechnology Letters**, v.25, n.10, p.767-771, May. 2003.

AN, G. H.; JANG, B. G.; CHO, M. H. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.2, p.121-125, 2001.

AN, G. H.; JOHNSON, E. A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.57, n.4, p.191-203, May. 1990.

AN, G. H.; et al. Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FO1C. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.82, n.5, p.515-518, 1996.

ANDREWES, A. G.; PHAFF, H. J.; STARR, M. P. Carotenoid of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, v.15, n.6, p.1003-1007, 1976.

ANDREWES, A. G.; STARR, M. P. (3R,3'R)-Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Phytochemistry**, v.15, n.6, p.1009-1011, 1976.

AQUASTA. **Astaxanthin partners Ltd**, 2007. Disponível em: <http://www.igene.com/>. Acesso em: 01 Set. 2008.

BCC. **Global market for carotenoids worth \$919 million by 2015**, 2008. Disponível em: www.bccresearch.com/pressroom/RFOD025C.htm. Acesso em: 11 Abr. 2008.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1980. 828 p.

BISBY, F. A.; et al. **Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2008 Annual Checklist**, 2008. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/search.php>. Acesso em: 05 Set. 2008.

BON, J. A.; LEATHERS, T. D.; JAYASWAL, R. K. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v.19, n.2, p.109-112, 1997.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. 1999. 159 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

BORGES, J. N. **Isolamento e caracterização de polissacarídeos da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma***. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BRASIL. **Produção Brasileira de Cana-de-Açúcar Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/PRODUCAO/PROD_CANA_BRASIL.PDF>. Acesso em: 03 Jun. 2008.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids**. ed. Berlin: Birkhäuser Verlag, 1995. p. 13-26.

CALIBEX. **Astaxanthin - price finder**, 2008. Disponível em: <<http://www.calibex.com/astaxanthin/zzcalibex2zB1z0--search.html>>. Acesso em: 01 Set. 2008.

CALO, P.; GONZALEZ, T. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. **Microbiology**, v.11, n.3, p.386-388, Sep. 1995.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W., et al. **Biotechnologia Industrial: engenharia bioquímica vol.2**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. p.

CARVALHO, W. C. Contagem das células sangüíneas. In: CARVALHO, W. C. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia**. 6ª ed. Belo Horizonte: Coopmed Editora, 1994. p. 73-80.

CHEN, X.; et al. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v.101, p.1580-1584, 2007.

CHYZANOWSKI, L.; et al. Phenol and n-alkanes (C-12 and C-16) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.24, n.9, p.1943-1949, Sep. 2008.

CYANOTECH. **BioAstin - Natural Astaxanthin**, 2008. Disponível em: <<http://www.cyanotech.com/bioastin.html>>. Acesso em: 01 Set. 2008.

DOMIGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUNOZ, J. A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.66, n.3, p.249-252, Dec. 2004.

- DUBOIS, M.; et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- ERNST, H. Recent advances in industrial carotenoid synthesis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, n.8, p.1369-1382, 2002.
- FANG, T. J.; CHENG, Y. S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, n.6, p.466-469, 1993.
- FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. **Process Biochemistry**, v.16, n.3, p.175-181, 1996.
- FANG, T. J.; WANG, J. M. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. **Process Biochemistry**, v.37, n.11, p.1235-1245, 2002.
- FDA. **Phaffia yeast**, 2000. Disponível em: <www.cfsan.fda.gov/~lrd/cfr73355.html>. Acesso em: 01 Set. 2008.
- FELL, J. W.; BLATT, G. M. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, n.1, p.677-681, Jul. 1999.
- FONTANA, J. D.; et al. Bioproduction of Carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v.58, p.121-125, 1996.
- GAD, M. ; ITOH, A.; IKAI, A. Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells using atomic force microscopy. **Cell Biology International**, v.21, n.11, p.697-706, 1997.
- GODWIN, T. W. Distribution of carotenoids - Methods in enzymology. **Carotenoids - Part A: Chemistry, separation, quantitation and antioxidation**, v.213, p.167-172, 1992.
- GOLUBEV, W. I. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**, v.11, n.2, p.101-110, Feb. 1995.
- GRYNBAUM, M. D.; et al. Unambiguous detection of astaxanthin and astaxanthin fatty acid esters in krill (*Euphausia superba* Dana). **Journal of Separation Science**, v.28, p.1685-1693, 2005.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W., et al. **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica vol. 2**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. p.
- HOUGH, L.; JONES, J. V. S.; WUSTEMAN, P. On the automated analysis of neutral monosaccharides in glycoproteins and polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.21, n.1, p.9-17, 1972.

- HU, Z. C.; et al. Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.771-775, 2005.
- HU, Z. C.; et al. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.586-590, 2006.
- HU, Z. C.; et al. Production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* ZJUT46 with fed-batch fermentation in 2.0 m³ fermentor. **Food Technology and Biotechnology**, v.45, n.2, p.209-212, Apr-Jun. 2007.
- JIRASRIPONGPUN, K.; et al. Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, n.2, p.112-116, Aug. 2008.
- JOHNSON, E. A. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. **International Microbiology**, v.6, n.3, p.169-174, Sep. 2003.
- JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.11, n.4, p.297-326, 1991.
- JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. **Journal of the Fishiers Research Board of Canada**, v.34, n.12, p.2417-2421, 1977.
- JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, v.115, p.173-183, 1979.
- KIM, S. K.; et al. Increased carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 using plant extracts. **The Journal of Microbiology**, v.45, n.2, p.128-132, Apr. 2007.
- KRESZE, G. B. Methods for protein determination. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. p. 84-99.
- KUSDIYANTINI, E.; et al. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v.20, n.10, p.929-934, October 1998. 1998.
- LEE, P. C.; SCHMIDT-DANNERT, C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.60, n.1-2, p.1-11, Oct. 2002.
- LIBKIND, D.; et al. Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, n.3, p.151-158, Mar. 2008.
- LIBKIND, D.; et al. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Appl Environ Microbiol**, v.73, n.4, p.1120-1125, Feb. 2007.
- LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **J Bacteriol**, v.180, n.15, p.3735-3740, Aug. 1998.

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.73, p.663-668, Aug. 2006a.

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Use of *n*-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.1033-1038, 2006b.

LIU, Z. Q.; et al. Improvement of astaxanthin production by a newly isolated *Phaffia rhodozyma* mutant with low-energy ion beam implantation. **J Appl Microbiol**, v.104, n.3, p.861-872, Mar. 2008.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J Biophys Biochem Cytol**, v.9, p.409-414, Feb. 1961.

MAGNELLI, P.; CIPOLLO, J. F.; ABEIJON, C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and β -1,6-glucan fine structure. **Anal Biochem**, v.301, n.1, p.136-150, Feb 1. 2002.

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J. C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v.15, n.9, p.919-924, Sept.1993. 1993.

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J. C. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, n.6, p.780-785, 1994.

MILLER, M. W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.26, n.2, p.286-291, 1976.

MORIEL, D. G. **Otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*, utilizando processo descontínuo alimentado**. 2004. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MORIEL, D. G.; et al. Effect of feeding methods on the Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.3, p.397-401, 2005.

NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell wall of several yeast species. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.50, n.206-212, 1998.

NI, H.; et al. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of beta-carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* extract. **J Zhejiang Univ Sci B**, v.6, n.6, p.514-522, Jun. 2005.

OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Influence of mixed culture conditions on yeast-wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.59, n.3, p.243-255, 1985.

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v.12, n.3, p.499-506, 2000.

OLIVEIRA, A. C. G.; et al. Análise das condições do comércio de Caldo de Cana em vias públicas de municípios paulistas. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.13, n.2, p.06-18, 2006.

OSUMI, M. The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Formation. **Micron**, v.29, n.2/3, p.207-233, 1998.

PALÁGYI, Z.; FERENCZY, L.; VAGVOLGYI, C. Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.95-97, 2001.

PARAJÓ, J. C.; et al. Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood. **Food Chemistry**, v.60, n.3, p.347-355, 1996.

PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para Aquicultura**. 2007. 88 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PATTERSON, M. K. Measurement of growth and viability of cells in culture. In: BUTLER, M. **Animal Cell Culture and Technology: The Basics** 2nd ed. London: Oxford, 2004.

PERSIKE, D.S.; et al. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). **Bioresource Technology**, v.82, n.1, p.79-85, Mar. 2002.

PIAO, H. L.; MACHADO, I. M. P.; PAYNE, G. S. NPFXD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. **Molecular Biology of the Cell**, v.18, p.57-65, 2007.

REIMER, L. **Transmission Electron Microscopy**. 4th ed. Berlin: Springer Verlag, 1997.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol**, v.17, p.208-212, Apr. 1963.

SCHAR-ZAMMARETTI, P.; et al. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. **Appl Environ Microbiol**, v.71, n.12, p.8165-8173, Dec. 2005.

SEAP. **Produção total de pescado estimada, por ano, segundo as regiões e unidades da Federação**, 2005. Disponível em: <[http://200.198.202.145/seap/Dados_estatisticos/boletim2005a\(tabela\).pdf](http://200.198.202.145/seap/Dados_estatisticos/boletim2005a(tabela).pdf)>. Acesso em: 01 Set. 2008.

SOKOLOVSKA, I.; et al. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. **Appl Environ Microbiol**, v.69, n.12, p.7019-7027, Dec. 2003.

STOREBAKKEN, T.; et al. Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feed processing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature. **Aquaculture**, v.231, p.489-500, 2004a.

STOREBAKKEN, T.; et al. Utilization of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of enzymatic cell wall disruption and feed extrusion temperature. **Aquaculture**, v.236, p.391-403, 2004b.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.33, n.4, p.309-314, Apr. 2006.

TRELSTAD, R. L.; REVEL, J. P.; HAY, E. D. Tight junctions between cells in the early chick embryo as visualized with the electron microscopy. **J Cell Biol**, v.31, n.1, p.C6-10, Oct. 1966.

USDA. **National Nutrient Database for Standard Reference**, 2008. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: 27 Fev. 2008.

USP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, 2004. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em: 27 Fev. 2008.

VERDOES, J. C.; et al. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Appl Environ Microbiol**, v.69, n.7, p.3728-3738, Jul. 2003.

WANG, W.; YU, L.; ZHOU, P. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresour Technol**, v.97, n.1, p.26-31, Jan. 2006.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J Biophys Biochem Cytol**, v.4, n.4, p.475-478, Jul 25. 1958.

WEBER, R. W. S.; et al. An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. **Mycological Research**, v.112, p.861-867, Jul. 2008.

WICK, L. Y.; WATTIAU, P.; HARMS, H. Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. **Environ Microbiol**, v.4, n.10, p.612-616, Oct. 2002.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetilation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.2, p.211-215, 1963.

WORANOVICZ, S. M. **Estudo comparativo de heteropolissacarídeos isolados dos líquens *Cladonia signata* (Eschw.) Vainio, *Cladonia furcata* (Hudson) Schrader e *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.** 1995. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

YAMANE, Y.; et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. **Biotechnology Letters**, v.19, n.11, p.1109-1111, 1997a.

YAMANE, Y.; et al. Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis. **Appl Environ Microbiol**, v.63, n.11, p.4471-4478, Nov. 1997b.